

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/82

A01H 5/00 //C12N9/10

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98802413.6

[43]公开日 2000年3月8日

[11]公开号 CN 1246894A

[22]申请日 1998.2.5 [21]申请号 98802413.6

[30]优先权

[32]1997.2.10 [33]US [31]60/036,946

[32]1997.6.4 [33]US [31]08/868,786

[86]国际申请 PCT/CA98/00055 1998.2.5

[87]国际公布 WO98/35051 英 1998.8.13

[85]进入国家阶段日期 1999.8.9

[71]申请人 加拿大农业及农业食品部

地址 加拿大艾伯塔省

[72]发明人 L·M·考楚克 J·D·阿姆斯特隆

D·R·林奇 N·R·诺勒斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

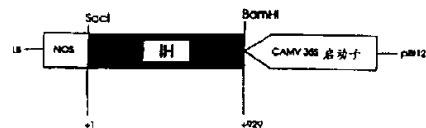
代理人 卢新华 谭明胜

权利要求书 5 页 说明书 68 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 具有降低的  $\alpha$  葡聚糖 L- 或 H- 型块茎磷酸化酶活性水平的低冷甜化转基因马铃薯

[57]摘要

提供了一种马铃薯植株,它表现出其块茎中具有降低的  $\alpha$  葡 L- 型 块茎磷酸化酶(GLTP)或  $\alpha$  葡聚糖 H- 型块茎磷酸化酶(GHTP) 活性水平。特别是当贮存在低于 7℃ 的温度下,表现出具有降低的 GLTP 或 GHTP 酶活性的马铃薯块茎中,淀粉变成糖的转化作用降低了。马铃薯中冷甜化作用降低,使马铃薯可贮存在较低的温度,导致休眠期延长,发病率降低,贮存寿命增加。还提供了产生这种马铃薯植株的方法,该植株可产生表现具有降低的 GLTP 或 GHTP 酶活性的块茎。通过如下技术可实现使马铃薯块茎中 GLTP 或 GHTP 活性降低:用同源性反义 RNA 抑制基因表达,应用共抑制,调节性沉默序列,化学的和蛋白质抑制剂,或者应用位点定向诱变或分离可替换性等位基因,以便获得具有降低的 淀粉亲和性或活性的 GLTP 或 GHTP 变体。



ISSN 1008-4274



## 权 利 要 求 书

1. 一种具有改善的块茎冷贮存特征的马铃薯植株，包括一种经修饰的马铃薯植株，相对于由未经修饰的马铃薯植株产生的块茎，此修饰植株产生的块茎中，具有降低的选自  $\alpha$  葡聚糖 L - 型块茎磷酸化酶 ( GLTP ) 和  $\alpha$  葡聚糖 H - 型块茎磷酸化酶 ( GHTP ) 的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性水平。

2. 权利要求 1 的马铃薯植株，是以具有有效地连接于一个 DNA 序列的植物启动子序列的表达盒转化的，此 DNA 序列当在此植株中转录时，将抑制选自 GLTP 基因和 GHTP 基因的内源性  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶基因的表达。

3. 一种具有改善的冷贮存特征的马铃薯植株，包括一种以具有有效地连接于一个 DNA 序列的植物启动子序列的表达盒转化的马铃薯植株，此 DNA 序列包括编码选自  $\alpha$  葡聚糖 L - 型块茎磷酸化酶 ( GLTP ) 和  $\alpha$  葡聚糖 H - 型块茎磷酸化酶 ( GHTP ) 的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶基因的至少 20 个核苷酸。

4. 权利要求 3 的马铃薯植株，其中编码的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶是 GLTP。

5. 权利要求 3 的马铃薯植株，其中编码的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶是 GHTP。

6. 权利要求 3 的马铃薯植株，其中的 DNA 序列包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 338 - 993。

7. 权利要求 3 的马铃薯植株，其中的 DNA 序列包含 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 147 - 799。

8. 权利要求 2, 3, 4, 5, 6 或 7 中任何之一的马铃薯植株，其中的 DNA 序列按反义取向连接于启动子序列。

9. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在收获时测定的葡萄糖和果糖总浓度，比未转化的植株块茎在收获时测定的葡萄糖和果糖总浓度，低至少 10 %。

10. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在收获时测定的葡萄糖和果糖总浓度，比未转化的植株块茎在收获时测定的葡萄糖和果糖总浓度，低至少 30 %。



11. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在收获时测定的葡萄糖和果糖总浓度, 比未转化的植株块茎在收获时测定的葡萄糖和果糖总浓度, 低至少80%。

5 12. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在4℃贮存约3个月后的葡萄糖和果糖总浓度, 比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的葡萄糖和果糖总浓度, 低至少10%。

13. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在4℃贮存约3个月后的葡萄糖和果糖总浓度, 比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的葡萄糖和果糖总浓度, 低至少30%。

10 14. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在4℃贮存约3个月后的葡萄糖和果糖总浓度, 比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的葡萄糖和果糖总浓度, 低至少39%。

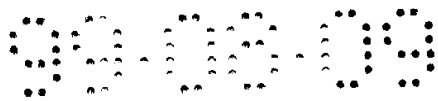
15 15. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在收获时测定的表示为所产生 $\mu\text{mol NADPH}/\text{mg}$ 蛋白质/小时的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 比未转化的植株块茎在收获时测定的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 低至少10%。

20 16. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在收获时测定的表示为所产生 $\mu\text{mol NADPH}/\text{mg}$ 蛋白质/小时的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 比未转化的植物块茎在收获时测定的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 低至少30%。

17. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在收获时测定的表示为所产生 $\mu\text{mol NADPH}/\text{mg}$ 蛋白质/小时的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 比未转化的植株块茎在收获时测定的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 低至少66%。

25 18. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在4℃贮存约3个月后测定的表示为所产生 $\mu\text{mol NADPH}/\text{mg}$ 蛋白质/小时的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 低至少10%。

30 19. 权利要求4的马铃薯植株, 其中该植株块茎在4℃贮存约3个月后测定的表示为所产生 $\mu\text{mol NADPH}/\text{mg}$ 蛋白质/小时的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 比未转化的植物块茎在相同条件下贮存后的总 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性, 低至少10%。



酸化酶活性，低至少 30 %。

20. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植物块茎在 4 °C 贮存约 3 个月  
5 个月后测定的表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg}$  蛋白质/小时的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 70 %。

21. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 3 个月  
10 个月后测定的表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg}$  蛋白质/小时的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 10 %。

22. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 3 个月  
15 个月后测定的表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg}$  蛋白质/小时的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 28 %。

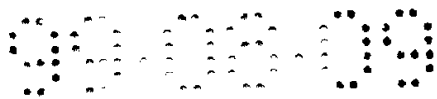
23. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 6 个月  
20 个月后测定的表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg}$  蛋白质/小时的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 10 %。

24. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 6 个月  
25 个月后测定的表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg}$  蛋白质/小时的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 30 %。

25. 权利要求 4 的马铃薯块茎，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 6 个月  
30 个月后测定的表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg}$  蛋白质/小时的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 69 %。

26. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 6 个月  
35 个月后测定的表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg}$  蛋白质/小时的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 10 %。

27. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 6 个月  
40 个月后测定的表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg}$  蛋白质/小时的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 10 %。



酸化酶活性，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，低至少 39 %。

28. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在收获时测定的薯片记分，比未转化的植株块茎在收获时测定的薯片记分，高至少 5 %。

5 29. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在收获时测定的薯片记分，比未转化的植株块茎在收获时测定的薯片记分，高至少 30 %。

30. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在收获时测定的薯片记分，比未转化的植株块茎在收获时测定的薯片记分，高至少 46 %。

10 31. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在收获时测定的薯片记分，比未转化的植株块茎在收获时测定的薯片记分，高至少 5 %。

32. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在收获时测定的薯片记分，比未转化的植株块茎在收获时测定的薯片记分，高至少 10 %。

15 33. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 3 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 5 %。

34. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 3 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 30 %。

20 35. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 3 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 89 %。

36. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 3 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 5 %。

25 37. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 3 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 10 %。

30 38. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 4 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 5 %。

39. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 4 个



月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 30 %。

40. 权利要求 4 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 4 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 89 %。

41. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 4 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 5 %。

42. 权利要求 5 的马铃薯植株，其中该植株块茎在 4 °C 贮存约 4 个月后的薯片记分，比未转化的植株块茎在相同条件下贮存后的薯片记分，高至少 25 %。

43. 一种改善马铃薯块茎冷贮存特征的方法，包括提供一种马铃薯植株，此植株已被修饰降低了块茎中选自  $\alpha$  葡聚糖 L - 型块茎磷酸化酶 ( GLTP ) 和  $\alpha$  葡聚糖 H - 型块茎磷酸化酶 ( GHTP ) 的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性水平。

44. 权利要求 43 的方法，包括：

将具有有效地连接于一个 DNA 序列的植物启动子序列的表达盒导入马铃薯植株，此 DNA 序列当在此植株中转录时，将抑制选自 GLTP 基因和 GHTP 基因的内源性  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶基因的表达。

45. 一种改善马铃薯块茎冷贮存特征的方法，包括：

将具有有效地连接于一个 DNA 序列的植物启动子序列的表达盒导入马铃薯植株，此 DNA 序列包含编码选自 GLTP 和 GHTP 的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶基因的至少 20 个核苷酸。

46. 权利要求 45 的方法，其中编码的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶是 GLTP 。

47. 权利要求 45 的方法，其中编码的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶是 GHTP 。

48. 权利要求 45 的方法，其中的 DNA 序列包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 338 - 993 。

49. 权利要求 45 的方法，其中的 DNA 序列包含 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 147 - 799 。

50. 权利要求 44, 45, 46, 47, 48, 或 49 中任何之一的方法，其中的 DNA 序列按反义取向连接于启动子序列。



## 说明书

### 具有降低的 $\alpha$ 葡聚糖 L - 或 H - 型块茎磷酸化酶 活性水平的低冷甜化转基因马铃薯

5 本申请要求 1997 年 2 月 10 日提交的美国临时专利申请号 60/036,946 的优先权, 该申请在此全部被引入作为参考。

#### 发明领域

本发明是关于通过降低马铃薯植株中  $\alpha$  葡聚糖 L - 型块茎磷酸化酶或  $\alpha$  葡聚糖 H - 型块茎磷酸化酶水平而抑制马铃薯中糖的积累。

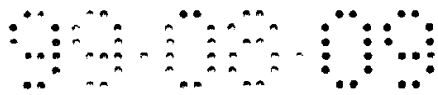
10

#### 发明背景

由广泛多种因素如疾病, 环境和马铃薯块茎 ( *Solanum tuberosum* ) 贮藏引起的植物胁迫, 是块茎品质的主要决定因素。收获至出芽之间的休眠期间对保持马铃薯的品质是关键性的。对马铃薯的处理通常是贮藏在 7 - 12 °C。与在 7 - 12 °C 贮藏相比较, 在 2 - 6 °C 冷贮藏通过降低呼吸, 减少水分丧失, 减少微生物感染, 减少发热损耗, 以及给予化学出芽抑制剂, 可提供最长的耐久保存 ( Burton, 1989 )。但是, 低温会导致冷诱发性甜化, 并且形成的高糖水平会促使其油炸产品出现不可接受的褐色或黑色 ( Coffin et al., 1987, Weaver et al., 1978 )。所积累的糖主要是葡萄糖, 果糖和蔗糖。首先是葡萄糖和果糖 ( 还原糖), 当在各种烹调处理如油炸过程中受热时, 经由 Maillard 反应过程与游离的氨基发生反应, 导致生成褐色色素 ( Burton, 1989, Shallenberger et al., 1959 )。蔗糖在油炸时由于焦糖化作用和炭化产生黑色。理想的还原糖含量一般认为是块茎湿重的 0.1 %, 上限为 0.33 %, 更高的还原糖含量就足以引起形成褐色和黑色色素, 导致不可接受的油炸产品 ( Davies and Viola, 1992 )。虽然在较高的温度 ( 7 - 12 °C ) 下贮藏可减慢还原糖的积累, 但是这样会增加微生物感染, 并需要使用生芽抑制剂。考虑到与化学剂使用相关的环境危害和对健康的威胁, 杀灭剂抗性病原体的形成, 以及现行使用的出芽抑制剂可能即将被禁止的事实, 需要有一种的马铃薯品种, 它能经受胁迫和长时间冷贮存不必使用化学药剂, 没有还原糖的积累, 并且对淀粉有较好的保存。

25

植物细胞中碳水化合物的代谢是一个复杂的过程。控制多种不同的

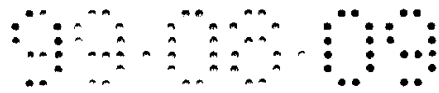


酶促反应过程都有可能影响冷贮藏过程中还原糖的积累，例如，抑制淀粉分解可减少游离糖的形成。通过降低糖含量的其它一些方法也可用于提高马铃薯的冷贮藏性能，包括用还原糖再合成淀粉，通过酵解和呼吸除去糖类，或者将糖转化成不能参与 Maillard 反应的其它形式。但是，许多酶促反应过程都是可逆的，并且对涉及碳水化合物代谢的绝大多数酶的作用尚缺乏了解。困难所在仍然是要找到一种酶，它能给予所希望的结果，能在低温下发挥功能，仍然使产品保持生产者，加工者和消费者所要求的品质。

已有人提出，磷酸果糖激酶（PFK）在冷诱发的甜化过程中起重要作用（Kruger and Hammond, 1988, ap Rees et al., 1988, Dixon et al., 1981, Claassen et al., 1991）。ap Reese et al. (1988) 指出，冷处理对碳水化合物代谢中的不同途径具有不均衡的作用，其中由于 PFK 的冷敏感性，酵解过程比较强烈地被降低了。然后，PFK 活性降低将导致用于蔗糖生成的可利用的己糖-磷酸增加。欧洲专利 0438904（Burrell et al. 1991, 7, 31）中公布的内容是，在贮藏过程中增加 PFK 活性，通过酵解和进一步代谢除去己糖可减少糖的积累。源于 E. Coli 的 PFK 可在马铃薯块茎中表达，并且此专利报告声称，在收获季节测定出 PFK 活性增加了，蔗糖含量降低了。但是已表明，在低温下焦磷酸：果糖 6 磷酸转移酶（PFK）仍有活性（Claassen et al., 1991）。象 PFK 一样，PFK 也能为酵解提供果糖 6 磷酸，因为这二个酶催化相同的反应。因此，这种改善冷贮存块茎品质的策略，其效果仍值得怀疑。而且，通过酵解和进一步代谢除去糖，并不是提高马铃薯块茎贮存性质的优选方法，因为通过呼吸作用会导致有用干物质的丧失。

还表明 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶（ADPGPP）在冷诱发的甜化过程中有重要的作用。在国际专利申请 WO 94/28149 中（Barry, et al., 1994, 5, 18 提交）曾公布，在贮存中增加 ADPGPP 活性，通过用还原性糖再合成淀粉可减少糖的积累。源于 E. Coli 的 ADPGPP 可在冷诱导性启动子的控制下在马铃薯块茎中表达，此专利报告声称，在收获时和在低温贮存后测定时表明块茎中 ADPGPP 活性增加了，还原性糖的含量较低。但是，此方案不是消除淀粉的分解代谢，而是代之增加淀粉再合成的速度。因此，通过酵解和呼吸进行糖分解代谢，再掺入淀粉的过程受到限



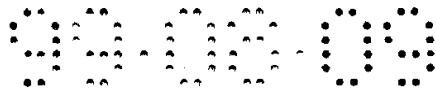


制。上调 ADPGPP 不是提高马铃薯块茎贮存性质的优选方法，因为通过呼吸作用会导致有用干物质的丧失。再次表明，涉及降低淀粉分解代谢的方法是优选的，因为干物质可被保存。

5 据认为淀粉降解涉及到几个酶，包括  $\alpha$  淀粉酶（内淀粉酶）， $\beta$  - 淀粉酶（外淀粉酶），淀粉葡糖苷酶和  $\alpha$  - 葡聚糖磷酸化酶（淀粉磷酸化酶）。通过减缓淀粉分解代谢，可防止还原性糖的积累，并且可使通过酵解和进一步代谢对糖的清除作用减到最小。

已经描述了三种不同的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的同功酶。块茎 L - 型  $\alpha$  1, 4 葡聚糖磷酸化酶（EC 2. 4. 1. 1）同功酶（GLTP）（Nakano and  
10 Fukui, 1986）对高度分支葡聚糖如糖原具有低亲和性，存在于肌浆中。其单体由 916 个氨基酸组成，与源于兔肌肉和 E. Coli 的磷酸化酶进行序列比较表明具有高水平的同源性，分别有 51 % 和 40 % 的氨基酸同源性。此 GLTP 基因的核苷酸序列和 GLTP 酶的氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 中。H - 型块茎  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的同  
15 功酶 H（GHTP）（Mori et al., 1991）对糖原具有高亲和性，定位于细胞质中。该基因编码 838 氨基酸，显示与块茎 L - 型磷酸化酶有 63% 的序列同源性，但发现在 L - 型多肽中缺少插入的 78 - 残基和 50 - 残基氨基端的延伸。此 GHTP 基因的核苷酸序列和 GHTP 酶的氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 中。已有报导  
20 （Sonnewald et al., 1995）第三个同功酶由 974 个氨基酸组成，与块茎 L - 型磷酸化酶高度同源，对绝大多数多肽有 81 % 的相同性。但是，含有过渡肽和插入序列的区域高度可变。此同功酶被称为叶 L - 型磷酸化酶，因为其 mRNA 在叶和块茎中同样地积累，而块茎 L - 型磷酸化酶的 mRNA 在马铃薯块茎中大量积累，在叶组织中只有微弱的积累。块茎 L  
25 - 型磷酸化酶主要存在于块茎中，叶 L - 型磷酸化酶在叶中较丰富（Sonnewald et al., 1995）。叶 L - 型磷酸化酶基因的核苷酸序列和叶 L - 型磷酸化酶的氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 中。

对各种淀粉降解酶的作用尚不了解，但是对相矛盾的结果已有相当  
30 多的争论。例如，降低叶 L - 型磷酸化酶的表达（Sonnewald et al., 1995）对淀粉积累没有显著的影响。Sonnewald 等（1995）曾报导，



叶 L - 型基因特异性的反义 RNA 的组成型表达, 导致叶组织中  $\alpha$  葡聚糖 L - 型磷酸化酶活性大大降低了, 但是对马铃薯块茎组织中的酶没有影响。因为  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性的反义抑制, 对转基因马铃薯植株叶中的淀粉积累没有显著的影响, 所以该作者得出结论, 淀粉降解不是由磷酸化酶催化的。鉴于已确定的  $\alpha$  葡聚糖磷酸酶的同功酶具有高水平的序列同源性, 预料对于 H - 型 ( GHTP ) 和 L - 型块茎 ( GLTP ) 同功酶也含有类似的阴性反应。

根据上面所述, 仍然需要这样一种马铃薯植株, 它能产生在以下条件下显示出低的淀粉向糖转化作用的块茎: 在繁殖过程中, 以及在室温和低温特别是在低于 7  $^{\circ}$ C 的温度下贮存过程中。

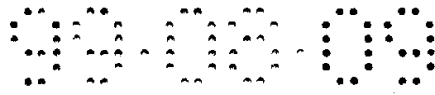
### 发明概述

本发明者惊奇地发现, 马铃薯块茎内  $\alpha$  葡聚糖 L - 型块茎磷酸化酶 ( GLTP ) 或  $\alpha$  葡聚糖 H - 型块茎磷酸化酶 ( GHTP ) 活性水平降低, 可导致在繁殖和贮存过程中, 相对于野生型马铃薯, 特别是在 10  $^{\circ}$ C 以下, 在 4  $^{\circ}$ C 贮存时, 块茎内糖的积累显著地降低。值得注意的是, 在块茎中复杂的碳水化合物代谢之下, 单个酶活性降低对减少块茎中糖的积累有效。就 Sonnewald 等 ( 1995 ) 以前所述的工作而论, 本发明者的发现更加令人吃惊, 他们报导, 降低对叶 L - 型磷酸化酶的表达对马铃薯植株叶中淀粉的积累没有显著的影响。

本发明可提供巨大的商业利益。其冷诱发的甜化被抑制或降低的块茎, 可贮存在较低的温度下, 而块茎中不会产生高水平的还原糖, 这种还原糖引起马铃薯油炸产品出现令人难以接受的黑色。块茎冷贮存可延长贮存时间, 通过限制呼吸和延迟出芽而延长休眠期, 还可降低发病率。

可通过多种已知方法中的任何一种, 实现降低马铃薯植株和块茎中 GLTP 或 GHTP 活性的目的, 包括但不限于 GLTP 或 GHTP mRNA 的反义抑制法, 共抑制法, 野生型 GLTP 或 GHTP 基因的位点定向诱变, 化学的或蛋白质抑制法, 或者通过植物育种程序。

因此, 概括地说, 本发明提供了一种经修饰的马铃薯植株, 与未修饰的马铃薯植株产生的块茎相比较, 此植株产生的块茎中具有较低水平的  $\alpha$  葡聚糖 L - 型块茎磷酸化酶 ( GLTP ) 或  $\alpha$  葡聚糖 H - 型块茎磷酸化酶 ( GHTP ) 活性。在优选的实施方案中, 本发明提供了以一种表



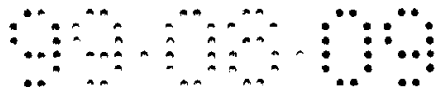
达盒转化的马铃薯植株，此表达盒具有有效地连接了一个 DNA 序列的植物启动子序列，此 DNA 序列当在植株中转录时，将抑制内源性 GLTP 基因或 GHTP 基因的表达。如在后面详述中还要论述的，上述 DNA 序列可按有义或反义取向插入此表达盒。可使本发明的马铃薯植株其 GLTP 或 GHTP 之一单独降低活性水平，或者也可使其 GLTP 和 GHTP 都降低活性水平。

如上面所述，本发明者发现，马铃薯植株中 GLTP 或 GHTP 酶活性水平降低，可导致马铃薯块茎中，特别是在低于 10 °C 的温度长期贮存时糖的积累降低。因此，本发明进一步扩展，提供一种方法，用于降低马铃薯植株所产生的块茎中糖的生成，包括降低此马铃薯植株中 GLTP 或 GHTP 的活性水平。在优选的实施方案中，这种方法包括将一个表达盒导入马铃薯植株，此表达盒具有有效地连接于一个 DNA 序列的植物启动子序列，此 DNA 序列在植株中转录时将抑制内源性 GLTP 基因或 GHTP 基因的表达。如上所述，此 DNA 序列可以按有义或反义取向插入此表达盒中。

如在本文实施例中所详述的，在通过本发明的方法转化的马铃薯品种 Desiree 中，已经看到了冷贮存特征的改善。冷贮存特征改善的直接测定指标，是在收获后的冷贮存后所检测的 GLTP 或 GHTP 酶活性水平的降低。与未转化植株块茎中在同样条件下贮存后的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性相比较，已形成的转化马铃薯品种，其植株块茎中表示为所产生  $\mu\text{mol NADPH/mg 蛋白质/小时}$  的总  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性，在 4 °C 贮存 189 天后降低达 70 %。

冷贮存特征改善的另一个比较直接的测定指标是，冷贮存一段时间之后所观察到的马铃薯甜化降低。与未转化植株块茎中在同样条件下贮存后的葡萄糖和果糖总浓度相比较，已形成的转化马铃薯品种其块茎中葡萄糖和果糖总浓度，在 4 °C 贮存 91 天后降低了 39 %。

还有一个证明本发明实际好处的冷贮存特征改善的鉴定指标是，在加工（烹调）过程中马铃薯片变黑程度降低。如前面所述，冷贮存过程中马铃薯中糖的积累会促使其油炸产品令人难以接受地变黑。以油炸马铃薯片的反射率为测定指标或薯片记分，可对油炸变黑程度降低作定量测定。在此将对测定薯片记分的技术进行论述。与未转化植株块茎在同



样条件下的薯片记分相比较，本发明形成的转化马铃薯品种，其植株块茎的薯片记分在 4℃ 贮存 124 天后升高达 89 %。

5 通过降低马铃薯植株的块茎中 GLTP 和/或 GHTP 活性，因此而抑制在低温贮存过程中的糖积累，本发明允许在比相同栽培种的野生型马铃薯更低的温度下贮存马铃薯。如上所述，在此传统所用的较低的温度下贮存马铃薯，可导致通过降低呼吸和生芽而增加贮存时间，延长休眠期，以及降低发病率。显然，对于本领域的技术人员，这样一些附加的好处也构成了改善的冷贮存特征，并可通过已知的技术量度和定量测定。

10

### 附图简述

将用如下附图对本发明的实施方案进行说明：

图1 是插入 pBI 121 转化载体的块茎 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶反义序列的示意图；

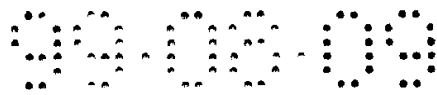
15 图 2 是插入 pBI 121 转化载体的块茎 H - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶反义序列的示意图；

图 3 显示三个分离的葡聚糖磷酸化酶同工酶的基本结构。过渡肽 ( TS ) 和插入序列 ( IS ) 是 L - 型磷酸化酶的特征，在 H - 型磷酸化酶中未发现。百分数指示各同工型之间核酸序列的同源性；

图 4 是马铃薯中碳水化合物相互转化的图解 ( Sowokinos 1990 ) ；

20 图 5 是马铃薯中发现的三个磷酸化酶同工型 - 区域氨基酸序列的比较，此区域是在此用于实施例中的反义 GLTP 结构所针对的区域。标明的氨基酸都相同。上面是叶 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的氨基酸序列 ( SEQ ID NO: 6 的氨基酸 21 - 238 )，中间是块茎 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的氨基酸序列 ( SEQ ID NO: 2 的氨基酸 49 - 266 )，下面是块茎 H - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的氨基酸序列 ( SEQ ID NO: 4 的氨基酸 46 - 264 ) ；

30 图 6A 和 6B 是马铃薯中发现的三个磷酸化酶同工型某区域核苷酸序列的比较，此区域是在此用于实施例中的反义 GLTP 结构所针对的区域。标明的核苷酸都相同。上面是叶 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的核苷酸序列 ( SEQ ID NO: 5 的核苷酸 389 - 1045 )，中间是块茎 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的核苷酸序列 ( SEQ ID NO: 1 的核苷酸 338 - 993 )，



下面是块茎 H - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的核苷酸序列 ( SEQ ID NO: 3 的核苷酸 147 - 805 ) ;

5 图 7 是聚腺苷酸化 RNA 的 northern 印迹, 此种 RNA 是从野生型, 以及用块茎 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶转化的品系 3, 4, 5 和 9 的马铃薯块茎中分离出的。是用放射性标记的块茎 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶特异性探针进行印迹探测;

图 8 是总 RNA 的 norther 印迹, 此种 RNA 是从野生型, 以及用 H - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸酶转化的品系 1 和 2 的马铃薯块茎中分离出的。是用放射性标记的 H - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶特异性探针进行印迹探测;

10 图 9 显示从如下品系的大田生长块茎, 在 4 °C 贮存 86 天后得到的油炸产品: ( A ) 野生型和块茎 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶转化体, ( B ) ATL 1, ( C ) ATL 3, ( D ) ATL 4, ( E ) ATL 5, ( F ) ATL 9, ( “ATL” = 反义块茎 L - 型转化体 );

15 图 10 显示  $\alpha$  1, 4 葡聚糖磷酸化酶 L - 型和 H - 型同功酶的活性凝胶电泳和免疫印迹, 这种酶是从野生型块茎和用 L - 型同工型反义构建物转化的块茎中提取的;

图 11 显示  $\alpha$  1, 4 葡聚糖磷酸化酶 L - 型和 H - 型同功酶的活性凝胶电泳和免疫印迹, 这种酶是从野生型块茎和用 H - 型同工型反义构建物转化的块茎中提取的。

## 20 优选实施方案的详述

提供了一种马铃薯植株, 由此植株产生的块茎, 与未修饰的马铃薯植株产生的块茎相比较, 具有降低水平的  $\alpha$  葡聚糖 L - 型块茎磷酸化酶 ( GLTP ) 或  $\alpha$  葡聚糖 H - 型块茎磷酸化酶 ( GHTP ) 活性。在此例证性情况下, 是通过以一个表达盒转化马铃薯植株来实现降低  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性的目的, 此表达盒具有有效地连接于一个 DNA 序列的植物启动子序列, 此 DNA 序列在植株中转录时将抑制内源性 GLTP 基因或 GHTP 基因的表达。虽然在此例证性情况下, 此 DNA 序列是按反义取向插入表达盒, 但是, 此 DNA 序列按有义或反义取向插入表达盒都能达到降低  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性的目的。

### 30 1. 同源依赖性沉默

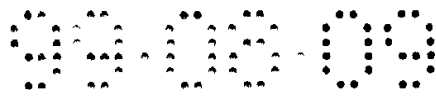
用有义或反义基因片段控制基因表达是标准的实验室措施, 在文献



中已被大量资料确证。反义和有义抑制是二个基因序列的同源 - 依赖性现象, 可被描述为“同源 - 依赖性沉默”现象。

5 1996 年发表的一篇科学论文的述评, 提及几百篇有关转基因植物中同源 - 依赖性沉默的报告。虽然对奠定同源 - 依赖性沉默基础的机理尚未完全理解, 但是已在许多植物基因中研究了此现象的特征, 并且对这些工作的主要部分已作了广泛的评述 ( Meyer and Saedler 1996, Matzke and Matzke 1995, Weintraub 1990, Van der Krol et al 1988 )。同源 - 依赖性沉默看来是可用于控制许多内源性基因活性的普遍现象。在导入同源序列后表现出降低表达的基因实例包括: 二氢黄酮醇还原酶  
10 ( Van der Krol 1990 ), 多聚半乳糖醛酸酶 ( Smith et al 1990 ), 八氢蕃茄红素合成酶 ( Fray and Grierson 1993 ), 果胶酯酶 ( Seymour et al 1993 ), 苯丙氨酸氨裂解酶 ( De Carvalho et al. 1992 ),  $\beta$  - 1, 3 - 葡聚糖酶 ( Hart et al. 1992 ), 几丁质酶 ( Dorlhac et al. 1994 ), 硝酸还原酶 ( Napoli et al. 1990 ), 以及苯基苯乙烯酮合成酶 ( 14 )。已有报告表明, 以马铃薯卷叶病病毒的包被蛋白基因的有义或反义构建体  
15 转化 Russet Burbank 马铃薯植株, 可赋予植株对马铃薯卷叶病病毒感染的抗性 ( Kawchuk et al. 1991 )。同源有义或反义序列的转移通常可产生具有降低内源性基因表达的转化体, 如在此实施例中所详述的, 表现出指示降低 GLTP 或 GHTP 表达的转化的马铃薯植株易被鉴定。

20 在反义抑制技术中, 装配了一种基因构建体或表达盒, 当它包括入植物细胞时, 将导致与由靶基因产生的 mRNA 互补的 RNA 序列的表达。推理认为, 由于此互补的 RNA 序列形成了双螺旋, 因此抑制了蛋白质翻译过程。在文献中, 包括“反义研究及其应用” ( CRC 出版, 1993 ) pp. 125 - 148, 已对决定有义和反义抑制基础的理论进行了论述。此互  
25 补序列的长度可以是与靶基因的全部序列相同, 但是一个片段通常是足够的, 而且操作更方便。例如, Cannon 等 ( 1990 ) 揭示, 短至 41 个碱基对的反义序列就足以达到基因抑制的目的。美国专利号 5, 585, 545 ( Bennett et al., December 1996 ) 描述了借助于只有 21 个碱基对的反义序列的基因抑制作用。在专利文献中, 有很多对用于通常将反义序列导  
30 入机体而抑制剂基因表达的方法进行描述和申请专利保护的例子包括例如, 美国专利号 5, 545, 815 ( Fischer et al., 1996 年 8 月 13 日 ) 和美国



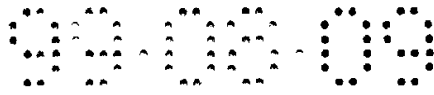
专利号 5,387,757 ( Bridges et al., 1995 年 2 月 7 日 )。

有义序列的同源 - 依赖性沉默可按照与反义抑制相类似的方式进行, 不同的是将核苷酸序列按正常有义取向插入表达盒。包括美国专利 5,034,323, 5,231,020 和 5,283,184 在内的许多专利公开了导入有义序列而导致基因表达抑制的方法。

同源 - 依赖性沉默的二种形式, 有义和反义抑制都可用于实现本发明下调 GLTP 或 GHTP 的目的。本领域的人员知道, 这二种技术对基因抑制是同等有效的策略。例如, 美国专利号 5,585,545 ( Bennett et al., 1996, 12, 17 ) 和美国专利号 5,451,514 ( Boudet et al., 1995, 9, 15 ), 都对类似于有义和反义抑制技术的用于抑制基因表达的方法, 或对在抑制基因表达方法中有用的重组 DNA 序列申请了专利保护。

## 2. 用于降低块茎中 GHTP 和/或 GLTP 活性的替代技术

虽然同源 - 依赖性沉默是本发明用于下调马铃薯植株中 GLTP 或 GHTP 的优选技术, 但是, 另外几种通常采用的策略也可用于降低特异性基因产物的活性, 本领域的专业人员将意识到它们也适合于本发明。将相关的基因或启动子插入植物, 可诱发同源的内源性转录物的快速周转, 是一种被称为共抑制作用的过程, 并据信与负责反义 RNA 抑制的机制有许多相似之处 ( Jorgensen, 1995, Brusslan and Tobin, 1995 )。DNA 的各种调节序列都可以改变 (启动子, 聚腺苷酸化信号, 转录后加工部位), 或者可用于改变特异性 mRNA 的表达水平 (增强和抑制)。另一种降低基因表达和减少其编码蛋白的策略是用核酶消化, 特异性地断开靶标 mRNA, 使它不能产生功能完整的蛋白质 ( Hasseloff and Gerlech 1988 )。对一种已鉴定是决定某特异性品质的重要酶, 可通过鉴别其天然存在的等位基因, 或形成基因工程等位基因, 改变其活性水平, 并用于经典的育种程序 ( Oritz and Huaman, 1994 )。位点定向诱变法也常用于改变某一被鉴定的基因产物的活性。可在 E. Coli 或其它适合的宿主内, 使磷酸化酶的结构编码序列发生诱变, 并对降低的淀粉磷酸酶解作用进行筛选。另一方面, 还可鉴别具有降低亲和性和/或具有特异亲和性的磷酸化酶天然存在的等位基因。此外, 特定酶的活性还可用各种抑制剂来改。这些方法都是常规使用的, 可在如 Sambrook et al ( 1989 ) 的教科书中找到。



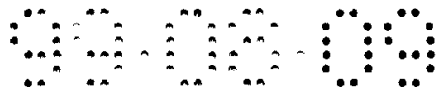
### 3. GLTP 和 GHTP 酶的变异体和用于同源依赖性沉默的序列

如在发明背景中所述，以及 Nakano et al. (1986)，Mori et al. (1991)，和 Sonnewald et al. (1990) 的详述，在马铃薯植株中存在三种已知的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的同功酶。本发明关系到下调 GLTP 和/或 GHTP 的同功酶。尽管据认为所有已知的商业用马铃薯品种的 GLTP 和 GHTP 基因都基本上相同，但是预期本发明的原理和技术对某些马铃薯植株是有作用的，这些植株具有某些不同的全长聚核苷酸序列或亚序列，这些序列能编码具有所述 GLTP 和 GHTP 酶的淀粉分解代谢催化活性的多肽。如在此和权利要求中所用的术语“GLTP”和“GHTP”，意在包括上述的变异体。上述的变异体可包括由于密码子的简并性而与作为例子的序列不同，但仍然编码相同多肽的 GLTP 和 GHTP 核苷酸序列变异体，以及编码能被特定抗体识别的蛋白质的变异体，这种抗体是针对在 SEQ ID NO: 2 和 4 中所列出的 GLTP 和 GHTP 氨基酸序列而产生的。

类似地，本领域的技术人员将意识到，用不同于作为例证的有义或反义序列，也可能实现使马铃薯中的 GLTP 和/或 GHTP 同源-依赖性沉默的目的。首先，从中衍生反义序列的 GLTP 或 GHTP cDNA 序列区不是必不可少的。其次，如上所述，所用反义序列的长度可能有相当大的差别。另外，有义或反义序列不必与将被抑制的靶标 GLTP 或 GHTP 基因的序列相同。如在此实施例中所述，本发明者已观察到，以来源于 GHTP 基因的反义 DNA 序列转化马铃薯植株，不仅能充分地抑制 GHTP 基因的活性，而且可引起 GLTP 基因活性的一定程度抑制。GHTP 和 GLTP 基因的反义序列有 56.8% 的序列相同。Sonnewald et al (1990) 描述的 GLTP 反义序列和相应的叶型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶序列之间的同一性是 71.3%。根据本发明者的研究资料，当用来源于 GLTP 基因的反义 DNA 序列转化马铃薯植株时，没有观察到同样的交叉下调现象。然而，这些结果清楚地表明，在 GLTP 活性被具有约 57% 的序列与靶标 GLTP 序列相同的反义序列抑制的条件下，靶标内源性  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶基因和重组 DNA 之间序列完全相同是不必要的。

因此，本领域的专业人员将能理解到，将与在此作例证的序列不同的有义或反义序列，以及不同于与靶标内源性 GLTP 或 GHTP 基因具有





完全序列同一性的有义或反义序列导入马铃薯植株细胞时，都能有效地引起内源性 GLTP 或 GHTP 基因抑制剂。借助于在为比较的目的而排列的部分序列上保守氨基酸的取代，或者相匹配核苷酸或氨基酸的百分数差异，有用的有义或反义序列可能不同于作为例证的反义序列，或者不同于来源于内源性 GHTP 或 GLTP 基因序列的其它序列。

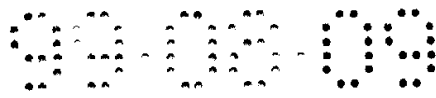
美国专利 5,585,545 (Bennett 等, 1996, 12, 17) 提供了有关如下技术的有益论述：比较多核苷酸和多肽序列的同一性，保守氨基酸的取代，以及指示序列同一性程度的杂交条件。在此将概述此论述的有关部分。

10 通过在一个比较窗口比较二个最佳匹配的序列，可确定多核苷酸和多肽序列同一性百分数，当为了最佳匹配这二个序列而与参照序列（它不包含增补或缺失）相比较时，其中在比较窗口内的部分多核苷酸或多肽序列可能包含有增补或缺失（即缺口）。此百分数的计算步骤如下：

（a）确定二个序列内存在相同核酸碱基或氨基酸残基位置的数目，得到匹配位置的数目；（b）以此匹配位置数目除以比较窗口内位置的总数；以及（c）将此结果乘以 100，得到序列同一性百分数。最佳的序列匹配比较可借助于已知算法的计算机执行程序来进行（例如 Wisconsin 遗传软件包中的 GAP，BESTFIT，FASTA 和 TFASTA，遗传计算机组（GCG），575 Science Dr., Madison, WI，或从国家生物技术信息中心可获得的 BlastN 和 BlastX），或者通过检测法进行。

20 可通过保守氨基酸的更换来区别特定的多肽，这种多肽除了不同的残基位置之外，具有基本上类似于上述的共有序列。保守氨基酸的取代是指具有类似侧链的残基的可互换性。例如，具有  $\alpha$  侧链的氨基酸组有甘氨酸，丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸和异亮氨酸；具有  $\alpha$ -羟基侧链的氨基酸组有丝氨酸和苏氨酸；具有含酰胺侧链的氨基酸组有天冬酰胺和谷氨酰胺；具有芳基侧链的氨基酸组有苯丙氨酸，酪氨酸和色氨酸；具有碱性侧链的氨基酸组有赖氨酸，精氨酸和组氨酸；具有含硫侧链的氨基酸组有半胱氨酸和甲硫氨酸。

30 如果二个核酸分子能在严格条件下相互特异性地杂交，是其核苷酸序列基本相同的另一个指示。严格条件是与序列有关的，并且随不同的环境条件而不同。一般而言，对于特定的序列，在确定的离子强度和 pH



下，严格条件选择为比热熔点 ( $T_m$ ) 低大约  $10\text{ }^\circ\text{C}$ 。  $T_m$  是 50 % 靶标序列能与准确匹配的探针杂交的温度 (在确定的离子强度和 pH 7)。杂交的  $T_m$  是探针的长度和碱基组成的函数，可按 Sanbrook et al (1989) 的描述计算。一般来说，用于 DNA 印迹试验方案的严格条件包括用  $0.2 \times \text{SSC}$  在  $65\text{ }^\circ\text{C}$  下漂洗。对于优选的寡核苷酸探针，漂洗条件通常是在  $6 \times \text{SSC}$  中大约  $42\text{ }^\circ\text{C}$ 。

#### 4. 一般方法

可用各种方法对植物细胞导入和表达外来的 DNA 序列。简略地说，制备反义  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶 cDNA，并将它导入植物细胞的步骤包括：  
10 (1) 从马铃薯植株分离出 mRNA，并从此 mRNA 制备 cDNA；(2) 从此 cDNA 中筛选出所需序列；(3) 按磷酸化酶基因表达的相反取向将一个启动子连接于此所需的 cDNA；(4) 转化适合的宿主植物细胞；以及 (5) 选择和再生转录此反义序列的细胞。

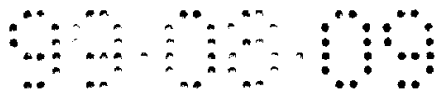
在此例证性情况下，是将来源于马铃薯 GLTP 和 GHTP 基因的 DNA  
15 用于构成表达盒，此表达盒具有有效地连接于一个反义 DNA 序列的植物启动子序列，此反义 DNA 序列在植株中转录时将抑制内源性 GLTP 基因或 GHTP 基因的表达。根瘤土壤杆菌可用作将此 DNA 传递给马铃薯苗茎外植体的载体。从转化的外植株再生的植株转录抑制此酶活性的反义 DNA。

20 在此所述的重组 DNA 技术，包括本领域技术人员熟知的标准的实验室技术，在权威性参考文献如 Sambrook et al (1989) 中已有描述。一般来说，包括 DNA 连接酶，DNA 聚合酶，限制性内切核酸酶等的酶促反应，可根据制造商的说明书进行。

#### 5. 制备 GHTP 和 GLTP cDNA

25 通过逆转录从分离出的马铃薯块茎 mRNA 制备 cDNA。使引物对此 mRNA 退火，形成可借助于逆转录酶用于延伸的游离的 3' 末端。当被与 mRNA 模板配对的互补碱基定向时，此酶可参与通常的 5' - 3' 延伸，形成杂交分子，此杂交分子是由模板 RNA 链与互补的 cDNA 链碱基配对组成。在原来的 mRNA 降解之后，DNA 聚合酶被用于合成互补的 DNA  
30 链，以便将此单链 cDNA 转化成为双链 DNA。

在 DNA 扩增之后，可将此双链 cDNA 插入一个载体，用于在 E. Coli



中进行增殖。一般来说，如果使用了表达载体，可通过核酸杂交，或对所编码蛋白的免疫检测，对带有所需 cDNA 的克隆进行鉴定。在此例证性情况下，问题被简化了，其中，如适合的引物序列一样，GLTP 和 GHTP 基因的 DNA 序列是已知的 (Brisson et al., 1990; Fukui et al., 1991)。所用的引物在 GLTP 和 GHTP 基因内杂交了。因此，不需要进一步分析就可以预计，所制备的扩增 cDNA 是 GLTP 和 GHTP 基因的一部分。可通过颜色选择对以携带磷酸化酶 DNA 插入片段的 PUC 19 质粒转化的 E. Coli 进行鉴别。以不携带插入片段的质粒转化的适当 E. Coli 菌株，生长呈兰色菌落。以携带插入片段的 pBluescript 质粒转化的菌株生长呈白色菌落。对从转化的 E. Coli 分离出的质粒进行测序，以便证实此磷酸化酶插入片段的序列。

## 6. 载体构建

可将所制备的 cDNA 按反义或有义取向插入表达载体中的表达盒，用于转化马铃薯植株，抑制马铃薯块茎中 GLTP 和/或 GHTP 基因的表达。

在涉及反义抑制的本例证性情况下，所需的重组载体将包含为启动植株中反义 cDNA 转录而设计的表达盒。包括一些额外序列以使载体能在细菌或噬菌体宿主中被克隆。

载体可优选地包含具有广泛宿主范围的原核生物复制起点。还应该包含一个可选择性标记，以便能选择具有所需构建物的细菌细胞。适合的原核生物选择性标记包括对抗菌素如氨苄青霉素的抗性。

如本领域专业人员所知，在载体内还可能存在编码辅助功能的其它 DNA 序列。例如，在土壤杆菌转化的情况之下，还应包含为随后转移至植物染色体的 T - DNA 序列。

为了在植物中表达，除了所需的序列之外，此重组表达盒还应包含植物启动子区，转录起始位点（如果待转录的序列缺少它），以及转录终止序列。在此盒的 5' 和 3' 末端，通常还包括独特的限制性酶切位点，使之易插入预先存在的载体。控制真核生物基因表达的序列对本领域专业人员也是熟知的。

将 DNA 转录成为 mRNA 是由被称为启动子的 DNA 区调控。启动子区含有提供 RNA 聚合酶与 DNA 关联的信号的碱基序列，并启动 mRNA



转录，用一条 DNA 链作模板，形成相应的互补 RNA 链。启动子序列成分包括 TATA 盒共有序列 ( TATAAT )，它通常是转录起始位点上游 ( 按照常规是相对转录起始位点的 -30 - -20 bp ) 的 20 - 30 个碱基对 ( bp )。在绝大多数情况下，为了精确的转录启动需要 TATA 盒。 TATA 盒是相对于起始位点具有较固定定位的唯一的上游启动子成分。

CAAT 盒共有序列集中在 - 75，但是可在显著不同于起始点的距离内发挥功能，并可在二个方向发挥功能。

另一种通用启动子成分是在 - 90 包含共有序列 GGGCGG 的 GC 盒，它可能以多拷贝和双取向的形式存在。

在启动子区还可能发现赋予组织特异性，对环境信号起反应的、或使转录最大有效的其它序列。这些序列常常发现在转录起始区的 400 bp 内，但是可能延伸远至 2000 bp 或更多。在异源性启动子/结构基因组合中，启动子优选地定位在距异源性转录起始位点大约相同的距离，与它在天然的定位中距转录起始位点一样的位置。但是，此距离可以有某些改变而不丧失启动子的功能。

用于此表达盒的特定启动子对本发明不是关键性的。在植物细胞中指导转录的许多启动子中的任何一种都适合的。此启动子可以是组成型的或者是诱导型的。

在文献中已描述了多种在植物细胞中有活性的启动子。它们包括胭脂碱合成酶 ( NOS ) 和章鱼碱合成酶 ( OCS ) 启动子 ( 它们被携带在根瘤土壤杆菌的诱导肿瘤的质粒中 )，花椰菜花叶病毒属启动子如花椰菜花叶病毒 ( CaMV ) 19 S 和 35 S，及玄参花叶病毒 35 S 启动子，来源于核酮糖 - 1, 5 - 二 - 磷酸羧化酶小亚单位 ( ssRUBISCO，一种含量非常丰富的植物多肽 ) 的光诱导性启动子，以及叶绿素 a/b 结合蛋白基因启动子等。所有这些启动子都已用于构成各种类型的 DNA 构建体，并在植物中进行了表达，参见例如 PCT WO 8402913。

在此用于实施例中的 CaMV 35S 启动子，已在绝大多数组织中显示出高度活性，并进行了组成型表达 ( Bevan et al., 1986 )。已知存在其它许多具有块茎特异性或加强表达的基因，包括马铃薯块茎 ADPGPP 基因的大和小亚单位 ( Muller et al., 1990 )。预期在本发明中有用的其它一些启动子包括，那些在马铃薯块茎中显示增强或特异性表达的启动

子，通常情况下与淀粉生物合成或修饰酶基因的表达有关的启动子，或者是那些显示出不同表达模式的启动子，例如在块茎发育过程中的不同时间表达的启动子。这些启动子的例子包括那些用于如下蛋白质基因的启动子：颗粒连接的和其它淀粉合成酶，分支酶（Blennow et al., 1991; WO 9214827; WO 9211375），歧化酶（Takaha et al., 1993），脱支酶，糖化酶，淀粉磷酸化酶（Nakano et al., 1989; Mori et al., 1991），果胶酯酶（Ebbelaar et al., 1993），40 kD 糖蛋白；遍在蛋白质，天冬氨酸蛋白酶抑制剂（Stukerlj et al., 1990），羧肽酶抑制剂，块茎多酚氧化酶（Shahar et al., 1992，GenBank 保存号 M 95196 和 M 95197），公认胰蛋白酶抑制剂和其它的块茎 cDNA（Stiekeme et al., 1988），以及糖化酶和 Sporemins 基因的启动子（Yoshida et al., 1992; Ohta et al., 1991）。

除了启动子序列之外，此表达盒还应包含位于结构基因下游的转录终止区，以便提供有效的终止作用。此终止区可从与启动子序列相同的基因获得，或者也可以从不同的基因获得。在本例证性情况下，使用了胭脂碱合成酶 NOS 3' 终止子序列（Bevan et al. 1983）。

如果由结构基因编码的 mRNA 将被有效地翻译，通常还要对载体构建体加入聚腺苷酸化序列（Alber and Kawasaki, 1982）。据认为聚腺苷酸化对 mRNA 具有稳定化作用。聚腺苷酸化序列包括但不局限于土壤杆菌章鱼碱合成酶信号（Gielen et al., 1984）或胭脂碱合成酶信号（Depicker et al., 1982）。

此载体一般还应包含一个可选择性标记基因，通过此基因可对培养的转化植物细胞进行鉴别。一般情况下，标记基因编码抗菌素抗性。这些标记包括对 G 418，潮霉素，争光霉素，卡那霉素，和庆大霉素的抗性。在本例证性情况下，标记基因赋予对卡那霉素的抗性。在转化植物细胞之后，通过它们在含有特定抗菌素的培养基中生长的能力，可鉴别那些含有此载体的细胞。

## 7. 转化植物细胞

虽然在本例证性情况下，马铃薯植株的苗茎外植体是通过以一种根瘤土壤杆菌接种而转化的，此根瘤土壤杆菌携带有连接于二元载体的反义序列，但是也可以采用本领域已知的直接转化技术来转移此重组



DNA。此载体可被直接微注射进入植物细胞。另一种方法是，可借助于带有包埋在微粒基质内或在其表面的所需核酸的微小颗粒，通过高速发射穿透作用，将核酸导入植物细胞，还可应用原生质体同脂质包被体如携带有所需 DNA 的小型细胞，细胞或溶酶体的融合作用。还可以通过电穿孔法将 DNA 导入植物细胞，其中是在携带有此表达盒的质粒存在下使植物原生质体电穿孔。

不同于直接转化的方法，本例证性情况采取了使用根瘤土壤杆菌的载体转化法。根瘤土壤杆菌是一种革兰氏阴性土壤细菌，它对双子叶植物引起被称为冠瘿的赘生物疾病。瘤的诱导作用是由被称为 Ti 质粒的瘤诱导性质粒引起的。Ti 质粒在感染的植物中定向合成冠瘿碱。冠瘿碱被土壤杆菌用作碳源和/或氮源。

此细菌并不进入植物细胞，但只转移部分被称为 T - DNA 部分的 Ti 质粒，此 T - DNA 可稳定地整合进入植物基因组，在此它表达合成冠瘿碱所需的功能，并转化植物细胞。Ti 质粒上 T - DNA 区外部的 Vir (毒力) 基因，对转移 T - DNA 是必须的。但是，Vir 区不被转移。实际上，虽然 Vir 区是 T - DNA 转移所需要的，但 Vir 区不需要真的连接于 T - DNA，而可能是在单独的质粒上被提供。

T - DNA 的瘤诱导性部分可以被断开或被删除，而不丧失其转移和整合功能，以致可产生正常的和健康的转化植物细胞，这种细胞已丧失了肿瘤细胞的所有特性，但仍然保有并能表达 T - DNA 的某些部分，特别是 T - DNA 边缘区的某些部分。因此，可用其中已删除了疾病引发性基因的被修饰 Ti 质粒作载体，用于将本发明的有义和反义基因构建体转移进入马铃薯植株（一般性地可参见 Winnecker, 1987）。

用土壤杆菌转化植物细胞和再生完整的植株，通常包括与分离的培养原生质体一起共培养土壤杆菌，或者用土壤杆菌转化完整的细胞或组织。在本例证性情况下，是用土壤杆菌转化来源于马铃薯幼苗培植物的茎外植体。

另一种选择是，可用花椰菜花叶病毒 (CaMV) 作载体将有义或反义 DNA 导入茄科植物。例如，美国专利号 No. 4, 407, 956 (Howell, 1983, 10, 4) 阐述了以花椰菜花叶病毒 DNA 作植物载体的用处。



## 8. 转化植株细胞的选择和再生

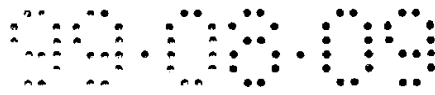
转化之后，必须对携带有反义或有义 DNA 的转化细胞或植株进行鉴别。一般是应用可选择性标记如抗菌素抗性。在本例证性情况下，是通过使细胞在含有卡那霉素的生长培养基中培养而对转化的植株细胞进行选择。其它的可选择性标记对本领域技术人员也是熟知的。例如，当用土壤杆菌转化植株时，冠瘿碱的存在可用于鉴别转化体。

应用熟知的方法如 RNA 印迹杂交法，通过检测由插入的 DNA 所编码的 RNA，可确证对外来 DNA 的表达。同样，借助于 DNA 印迹杂交或聚合酶链反应，可对插入的 DNA 序列本身进行鉴别（一般可参阅 Sambrook et al. (1989)）。

一般地说，在确定此转化的植物细胞携带有重组 DNA 之后，可将全部植株再生。在本例证性情况下，是用携带有所需反义 DNA 和卡那霉素标记基因的根瘤土壤杆菌培养物，接种马铃薯幼苗培养物的茎和叶外植体。在含有卡那霉素的生长培养基上选择转化体。转移至适当的培养基作幼苗诱导之后，将幼苗转移至适合生根的培养基。然后将植株转移至土壤使之强化。将此培养再生的植株移植后，使之在暖房条件下生长至成熟。

## 9. 分析转化的块茎中 GHTP 和 GLTP 的活性水平

使以来源于 GHTP 和 GLTP 基因的反义 DNA 序列转化的马铃薯植株再生之后，用几种方法对转化的块茎组织进行生化分析。按照 Steup (1990) 的方法测定了在体外磷酸化反应中  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的活性（表 1）。在含糖原的聚丙烯酰胺凝胶上对酶同工型作电泳分离之后，对在合成反应中的酶活性，以及酶蛋白的含量进行了比较（图 7）。在与葡萄糖-1-磷酸和淀粉引物共温育之后，借助于对凝胶的碘染色测定了块茎 L-型和 H-型酶同工型的淀粉合成作用（Steup, 1990）。通过将来自相同的未温育原凝胶中的蛋白质印迹在硝酸纤维素膜上，并用对块茎 L-型和 H-型葡聚糖磷酸化酶的同工型特异的多克隆抗体作探针，进行了蛋白质印迹分析。借助于 HPLC 对块茎组织中还原糖（葡萄糖和果糖）的水平作定量分析（表 2, 3 和 4）。通过油炸后确定薄片的得分检定了 Maillard 反应的程度，此反应与块茎中还原糖的浓度成正比（表 5 和图 6）。



## 10. 定义

在此和权利要求中使用的术语规定如下:

“大约 3 个月”，“大约 4 个月”和“大约 6 个月”分别意指 3 个月  $\pm$  2 周，4 个月  $\pm$  2 周，和 6 个月  $\pm$  2 周的一段时间;

5 “反义取向”意指相对于其天然存在时的取向，被插入表达盒中来源于结构基因的核酸序列，是按倒转的方式取向。当此序列是双链时，按天然存在取向的作为模板的链成为编码链，反之亦然;

10 块茎“薯片记分”意指对中心切片的马铃薯薄片，在豆油中 205 °F 油炸大约 3 分钟至起泡为止，然后以 Agtron E - 15 - FP 型直读式简易分光光度计 ( Agtron Inc. 1095 Spice Island Drive # 100, Sparks Nevada 89431 ) 测定的反射读数;

“冷贮存”或“低温贮存”，或者其变化形式，都将意指保持在低于 10 °C 的温度，可通过致冷作用或环境温度达到;

15 “内源性”当它用于马铃薯植株的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶基因时，将意指在导入携带有来自  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶基因 DNA 序列的表达盒之前，已存在于马铃薯植株基因组中的天然存在的基因;

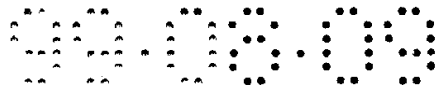
“表达”是指结构基因的转录和翻译，以致蛋白质被合成;

“异源性序列”或“异源性表达盒”是来源于外来种的序列，或者，如其是来源于相同种，已被修饰基本上不同于其原来的形式;

20 “改善的冷贮存特征”包括而不局限于薯片记分的改善和在收获时或 10 °C 以下贮存一段时间之后测定的块茎中糖积累降低，以及进一步包括由于在比传统采用的较低温度贮存马铃薯而获得的改善、优点和好处，包括但不局限于，增加马铃薯的贮存时间，通过降低马铃薯呼吸和发芽而增加休眠时间，以及降低发病率。除非通过特殊的测定或试验另  
25 有限制，冷贮存特征的改善指的是相对于对照，野生型或未修饰的马铃薯植株的所描述特征差异。

“修饰”或其改变形式，当用于描述马铃薯植株或块茎时，是用于区分已通过如下方法使之不同于其天然存在状态的马铃薯植株或块茎：  
30 导入来源于相同或不同种的核苷酸序列，无论按有义或反义取向，也无  
论是通过重组 DNA 技术或借助于传统的杂交育种法，包括导入修饰的结  
构性序列或调控序列；通过位点定向诱变作用修饰天然的核酸序列或相





反情况；或者用化学剂或蛋白质抑制剂处理马铃薯植株。“未修饰的”马铃薯植株或块茎意指未经上述修饰的对照，野生型或天然存在的马铃薯植株或块茎；

5 “核酸序列”或“核酸区段”指的是从5'末端至3'末端解读的单链或双链脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的多聚体。它包括自我复制的质粒，感染性DNA或RNA多聚体，以及非功能性DNA或RNA；

“有效地连接”是指启动子和第二个序列之间的功能性连接，其中，启动子序列可启动相应于第二序列的RNA转录；

10 “植株”包括整株植物，植物器官（例如叶，茎，根等），幼苗和植物细胞；

“启动子”是指结构基因上游的DNA区，此区与对启动转录的RNA聚合酶和其它蛋白质的识别和连接有关。“植物启动子”是能够在植物细胞中启动转录的启动子；

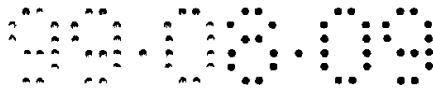
15 “降低的活性”或其改变形式，当用于马铃薯块茎中GLTP或GHTP酶活性时，包括如下情况引起的GLTP或GHTP酶活性降低：GLTP或GHTP基因产物的表达降低，GLTP或GHTP酶的底物亲和性降低，以及GLTP或GHTP酶的催化活性降低；

20 “降低”或其改变形式，在此可用于，而不局限于马铃薯块茎中GLTP或GHTP酶的活性水平，马铃薯块茎中糖的积累，以及油炸时马铃薯薄片的变黑。除非通过特殊的测定或试验另有限制，降低的水平或降低的活性指的是所描述的特征相对于对照，野生型或未修饰的马铃薯植株的特征有可证明的统计学显著性差异；

25 “胁迫”或其改变形式，当用于关系到马铃薯植株和块茎经历的胁迫时，包括影响植株或块茎品质的环境，肥料，湿度，温度，处理，疾病，大气和老化的作用，并且在马铃薯植株生命循环的所有阶段，在马铃薯块茎生长发育循环的所有阶段，以及在随后的收获，运输，贮存和加工过程中都可能经历的作用；

“胁迫抗性”或其改变形式将意指温度，老化，疾病，大气，物理处理，湿度，化学残留，环境，虫害和其它胁迫的影响降低了；

30 “适合的宿主”指的是可与重组的质粒，DNA序列或重组的表达盒共存的微生物或细胞，并且将允许此质粒复制，掺入其基因组，或进行



表达;

“未断裂的”指的是包含缺少间插, 未翻译序列的开放读框的 DNA 序列 (例如 cDNA)。

5

### 实施例 1

此实施例描述, 通过以包含特定 DNA 序列的表达盒转化马铃薯植株来降低马铃薯植株块茎中 GHTP 和/或 GLTP 的活性, 此 DNA 序列是来自以反义取向连接于启动子的 GLTP 和 GHTP 基因序列。

#### A 分离马铃薯块茎 mRNA

10 在液氮下用研钵和研杵将 1 克块茎组织研磨成细粉, 然后用高压灭菌的试剂在 4 °C 下从其中精制马铃薯总 RNA。将此细粉转移至 30 ml 的 Corex 管内, 加入 3 倍体积的 100 mM Tris - Cl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 和 10 mM EDTA ( 10 × TNE ), 其中含有 0.2 % ( w/v ) SDS 和 0.5 % ( v/v ) 2 - 巯基乙醇。加入等体积苯酚 - 氯仿 ( 1 : 1 ), 缓慢旋转搅拌样品, 然后在 4 °C 用 SS 34 转子以 8000 rpm 转速离心 5 分钟。  
15 有机相用 0.5 体积含 0.2 % ( w/v ) SDS 和 0.5 % ( v/v ) 2 - 巯基乙醇的 10 × TNE 再提取, 合并水相, 用氯仿提取。用乙酸钠和无水乙醇从水相中沉淀出核酸, 离心收集沉淀并再悬浮于 3 ml 1 × TNE 中。加入等体积 5M LiCl, 将样品在 - 20 °C 放置 4 小时, 然后在 SS 34 转子内,  
20 以 8000 rpm 的转速在 4 °C 离心 10 分钟。用 70 % 乙醇洗此 RNA 沉淀, 干燥后再悬浮于 DEPC 处理的水中。

应用寡脱氧胸苷酸纤维素 ( Boehringer Mannheim ) 柱层析分离出聚 ( A<sup>+</sup> ) RNA ( Poly ( A<sup>+</sup> ) RNA )。从再悬浮于无 RNase 水中的总 RNA 分离出了 Poly ( A<sup>+</sup> ) RNA。柱制备法是用高压灭菌的 10 ml Bio -  
25 Rad Poly - Prep 柱, 加入 50 mg 悬浮于 1 ml 加样缓冲液 B 中的寡脱氧胸苷酸 ( oligo(dT) ) 纤维素, 此加样缓冲液 B 含有 20 mM Tris - Cl, pH 7.4, 0.1M NaCl, 1 mM EDTA 和 0.1 % ( w/v ) SDS。先用 3 倍体积含有 5 mM EDTA 的 0.1 M NaOH 洗柱, 然后用 DEPC 处理的水洗柱, 直至用 pH 试纸检测时流出液的 pH 小于 8 为止。然后用 5 倍体  
30 积含有 40 mM Tric - Cl, pH 7.4, 1 M NaCl, 1 mM EDTA 和 0.1% ( w/v ) SDS 的加样缓冲液 A 洗柱。

将 RNA 样品加热至 65 °C 持续 5 分钟，在此时间内，加入预热至 65 °C 的加样缓冲液 A 400  $\mu$ l。混匀样品，在室温下冷却 2 分钟。然后对柱加样。收集洗脱液，加热至 65 °C 持续 5 分钟，冷却至室温 2 分钟，再对柱加样。随后用 5 倍体积的加样缓冲液 A 洗脱，再用 4 倍体积加样缓冲液 B 洗脱。用 3 倍体积的 10 mM Tris - Cl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 和 0.05 % ( w/v ) SDS 洗脱出 Poly (A<sup>+</sup>) RNA。收集各组分，对含有 RNA 的组分用溴化乙啶试验板鉴定，这是一种用含有 EtBr 的 TAE 制成的有 1 % 琼脂糖的培养皿。使 RNA 沉淀，再悬浮成 10  $\mu$ l，取 1  $\mu$ l 用分光光度计作定量分析。

## 10 B 分离 GLTP 和 GHTP DNA 序列

用于形成反义构建体的核苷酸序列随机地选自 GLTP ( SEQ ID NO: 1 ) 和 GHTP ( SEQ ID NO: 3 ) 的 5' 序列。应用逆转录 - 聚合酶链反应获得了用于形成反义构建体的 DNA 序列。根据已发表的序列 ( Brisson et al., 1990, Fukui et al. 1991 ) 进行较小的修饰以便于酶限制性内切，设计了 GLTP ( SPL 1 和 SPL 2 ) - 和 GHTP ( SPH 1 和 SPH 2 ) 特异性引物：

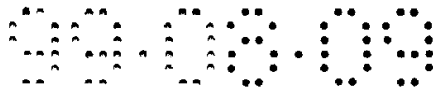
SPL 1 引物： 5' ATTCGAAAAGCTCCGAGATTTGCATAGA 3' ( SEQ ID NO: 7 ) ( 补充的 CG 构成 Xho I 位点 ) ；

SPL 2 引物： 5' GTGTGCTCTCCGAGCATTGAAAGC 3' ( SEQ ID NO: 8 ) ( 将 C 改变为 G 构成 Xho I 位点 ) ；

SPH 1 引物： 5' GTTTATTTTCCATCGATGGAAGGTGGTG 3' ( SEQ ID NO: 9 ) ( 加入 CGAT 构成 Cla I 位点 ) ；

SPH 2 引物： 5' ATAATATCCTGAATCGATGCACTGC 3' ( SEQ ID NO: 10 ) ( 将 G 改变为 T 构成 Cla I 位点 ) 。

在 15  $\mu$ l 的体积内进行逆转录，其中含有 1  $\times$  PCR 缓冲液 ( 10 mM Tris - Cl pH 8.2, 50 mM KCl, 0.001 % 明胶, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ), 670  $\mu$ l 各种 dNTP, 6  $\mu$ g 马铃薯块茎 cv. Russet Burbank RNA, 1 mM 每种引物 ( SPH 1 和 SPL 2, 或 SPH 1 和 SPH 2 ), 以及 200 U Maloney 鼠白血病毒逆转录酶 ( BRL )。此反应在 37 °C 进行 30 分钟，然后在 94 °C 热灭活 5 分钟，再在冰上快速冷却。对此逆转录反应物加入在 35  $\mu$ l 1  $\times$  PCR 缓冲液中的 2.5 U Taq DNA 聚合酶 ( BRL )。在 Perkin



Elmer 480 中进行 DNA 扩增, 编程 30 个循环, 1 分钟的 94 °C 变性步骤, 1 分钟的 56 °C ( SPL 1 和 SPL 2 ) 或 58 °C ( SPH 1 和 SPH 2 ) 退火步骤, 以及 2 分钟的 72 °C 延伸步骤。以最后 10 分钟 72 °C 延伸完成 PCR。

### C 构建用于磷酸化酶抑制作用的 SP 载体

5 为了在植物细胞中表达反义构建体, 有必要使此基因与适合的植物调节区融合。可通过将此反义 DNA 克隆进入含有所需序列的质粒载体来实现这种融合。

使扩增的 DNA 形成平端, 并被克隆进入 pUC 19 载体的 SmaI 位点。将此重组质粒转化进入有效亚克隆的 E. Coli DH 5 $\alpha$  细胞 ( BRL )。

10 将此转化的细胞接种在含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/ml 的 LB ( 15 g/L Bactotptone, 5 g/L 酵母浸膏, 10 g/L NaCl, pH 7.3, 以 1.5 % 琼脂固化 ) 平板上。应用颜色选择法, 对包含带有插入植物磷酸化酶序列的质粒的细菌进行了选择。在 LacZ 基因片段的 N - 端部分存在多接头及 T3 和 T7 RNA 聚合酶启动子序列。在多接头没有插入片段的 pUC 19 质粒,

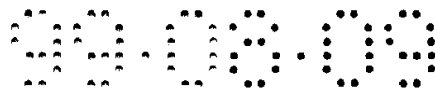
15 在适当的菌株如 DH 5 $\alpha$  内生长呈兰色菌落。通过在接种转化体之前 30 分钟, 将 100 $\mu$ l 2 % X - gal ( 在二甲基甲酰胺中配制的 ) 分散在含有 50  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上制备颜色选择平板。在 37 °C 培育 12 - 18 小时之后, 包含没有插入片段质粒的菌落呈兰色, 而带有会插入片段质粒的菌落仍然呈白色。对分离的质粒测序证实了磷酸化酶插入片段的

20 序列。用 ABI Prism 染色终止了循环测序核心试剂盒 ( Applied Biosystems, foster City, CA ), M13 通用和反引物, 以及 ABI 自动 DNA 测序仪, 进行序列测定。通过从 5 ml 过夜的培养物进行快速碱提取程序, 对此工程质粒进行了纯化 ( Birnboim and Doly, 1979 )。通过限制性酶切消化确定了 pUC 19 中 SPL 和 SPH 片段的取向。对重组 pUC 19 载体

25 和二元载体 pBI 121 ( Clontech ) 作限制性酶切, 进行琼脂糖凝胶电泳, 并通过凝胶分离纯化各片段, 如 Thuring et al ( 1975 ) 所描述。

通过连接反应将此反义序列融合于二元载体 pBI 121。此连接体含有已被 BamHI 和 SacI 消化的 pBI 121 载体, 以及已用 BamHI 和 SacI 从 pUC 19 亚克隆切开的 SPL 或 SPH 磷酸化酶 DNA 产物。使连接的 DNA

30 转化进入 SCE E. Coli DH 5 $\alpha$  细胞, 并将此转化细胞接种在含氨苄青霉素的 LB 平板上。反义 DNA SPL 和 SPH 的核苷酸序列分别是 SEQ ID



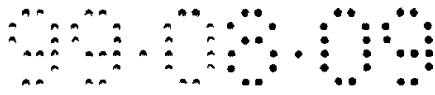
NO: 1 的核苷酸 338 - 993, 以及 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 147 - 799。以 CAMV 和 NOS 特异性引物对带有磷酸化酶插入片段的 pBI 121 进行选择。

5 培养过夜之后, 从平板上挑选出了代表块茎 L - 型和块茎 H - 型磷酸化酶 DNA 片段的样品 1 和样品 2。将这些样品接种进入 5 ml LB 培养基中, 37 °C 培养过夜。通过快速碱提取程序分离出质粒, 其 DNA 被电穿孔转化进入根瘤土壤杆菌。

通过基因工程, 使含有 CaMV 35S 启动子 ( Kay et al. 1987 ) 和 NOS 3' 终止子 ( Bevan et al. 1983 ) 序列的构建体构建进入 pBI 121 载体。  
10 此 pBI 121 质粒是由如下明确鉴定的 DNA 区段组成。从转座子 Tn 7 中从离出的 0.93 kb 片段, 它编码细菌的壮观霉素/链霉素 ( Spc/Str ) 抗性, 并且是在 E. Coli 和根瘤土壤杆菌中进行选择的决定因子 ( Fling et al. 1985 )。将此片段连接于为植物表达构建的嵌合的卡那霉素抗性基因, 使之能够对转化的组织进行选择。此嵌合基因是由 0.35 kb 的花椰菜花叶  
15 病毒 35 S 启动子 ( P - 35 S ) ( Odell et al., 1985 ), 0.83 kb 的新霉素磷酸转移酶 II 型基因 ( NPTII ), 以及 0.26 kb 的胭脂碱合成酶基因的 3' 非翻译区 ( NOS 3' ) ( Fraley et al., 1983 ) 组成。另一个区段是来自 RK 2 质粒的 0.75 kb 的复制起点 ( ori - V ) ( Stalker et al., 1981 )。此区段连接于 pBR 322 的 3.1 kb 的 Sall - PvuI 区段, 它提供  
20 保持在 E. Coli 中的复制起点 ( ori - 322 ) 以及用于在根瘤土壤杆菌细胞中接合转移的 bom 位点。再一个区段是来自 pTiT 37 质粒的 0.36 kb PvuI 片段, 它包含胭脂碱型 T - DNA 的右边缘区 ( Fraley et al., 1985 )。通过使其基因置于组成型组织非特异性启动子的控制之下, 此反义序列被构建在块茎中进行表达。

#### 25 D 植株的转化/再生

按照 Block ( 1988 ) 的方法, 使 SPL 和 SPH 载体转化进入 Desiree 马铃薯栽培种。为了转化 “Desiree” 马铃薯, 将 “Desiree” 的无菌幼苗培养物保存在试管内, 其中含有 8 ml S1 ( 以 2 % 蔗糖和 0.5 g/L MES pH 5.7 补充的, 以 6 g/L Phytagar 固化的 Murashige 和 Skoog ( MS )  
30 培养基 )。当小植株达到大约 5cm 长度时, 用单面刀片沿基部切下叶片, 并以 1:10 稀释的培养过夜的根瘤土壤杆菌接种叶片。在 S1 培养基上,



20 °C 共培养外植体 2 天 ( De Block, 1988 )。共培养之后, 将此外植体转移至 S 4 培养基培养 1 周, 然后再培养 2 周诱发愈伤组织形成 ( S 4 培养基是没有蔗糖, 以 0.5 g/L MFS pH 5.7, 200 mg/L 谷氨酰胺, 0.5 g/L PVP, 20 g/L 甘露糖醇, 20 g/L 葡萄糖, 40 mg/L 腺嘌呤, 1 mg/L 反式玉米素, 0.1 mg/L NAA, 1 g/L 羧苄青霉素, 50 mg/L 卡那霉素补充的, 以 6 g/L phytagar 固化的 MS 培养基)。

3 周之后, 将外植体转移至 S 6 培养基 (没有 NAA 和具有一半羧苄青霉素浓度 ( 500 mg/L ) 的 S 4 培养基)。再过 2 周之后, 将此外植体转移至 S 8 培养基 (只含有 250 mg/L 羧苄青霉素和 0.01 mg/L 赤霉酸, GA 3 的 S 6 培养基), 促进幼苗形成。转移至 S 8 苗诱导培养基后约 2 周幼苗开始形成。切取这些幼苗, 转移至 S 1 培养基的小瓶内生根。在生根培养基上繁殖约 6 周之后, 将此植株转移至土壤, 使之逐渐变强壮。

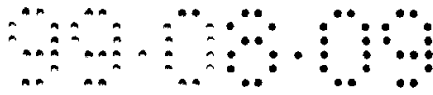
将在培养中再生的 Desiree 植株移植至 1 加仑容量的花盆中, 在温室条件下生长至成熟。收获块茎, 使其在室温下栓化二天。收集长度大于 2cm 的所有块茎, 在 4 °C 高湿度下贮存。

## E 田间试验

将未转化的对照, 表达 SPL 构建体的植株, 以及表达 SPH 构建体的植株, 按单重复随机化设计在田间试验中繁殖。使所有的植株在同一田间并排生长, 接受相似的农药, 肥料和灌溉安排。收获块茎, 先在 10 °C 贮存 2 周, 然后从每个品系随机选择部分块茎置于 4 °C 贮存。

## F 糖分析

将块茎贮存于 4 °C, 不允许其在室温下恢复就立即进行糖分析测定。从每个块茎的中心部分切取完整的纵向切片 ( 1 cm 厚, 宽度可变, 相当于块茎的外径), 这代表所有的块茎组织, 每次收获时, 将来自每个克隆 ( 3 个重复样品) 的 4 个块茎的中心块共同切成 1 cm 的小立方体, 从此合并的组织随机选择 15 g 用于分析。用 polytron 匀浆器, 在 4 °C 下以含有 2 mM 硫酸氢钠, 2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF 和 10 % ( w/w ) 甘油的 15 ml Tris 缓冲液 ( 50 mM, pH 7.0 ) 提取葡聚糖磷酸化酶 ( 见下面) 和糖类。将提取液在 4 °C 离心 ( 30000 g, 30 分钟), 然后将上清液稀释 10 倍, 用装有折光指数检测器的 Spectra Physics 高效液相层析仪测定还原糖 ( 葡萄糖和蔗糖)。在 80 °C 下, 在 30 × 0.78cm



的 Aminex HPX 87C 柱 ( Biorad ) 上, 用 0.6 ml/分钟流速的水作流动相进行分离。借助于标准 d - 葡萄糖和 d - 蔗糖对仪器进行校准。

### G $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶活性分析

对贮存于 4  $^{\circ}$ C 的块茎, 不使其温暖就立即进行提取和  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性和同功酶分析。按 Steup ( 1990 ) 所述的方法, 测定葡聚糖磷酸化酶在体外磷酸化反应中的活性。简单地说, 是将所获得用于糖分析的提取物样品加到一种反应基质中, 这种反应基质通过葡糖磷酸变位酶和葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶的连续反应, 使淀粉的磷酸化作用与 NADP 的还原作用相偶联。此反应过程中 NADP 的还原速率与从淀粉基质葡萄糖 - 1 - 磷酸产生的速率具有理想的化学计量配比。用 Varian Cary 双光束分光光度计在 340 nm 对 NADP 的还原作用进行了监测。按照 Bredford ( 1976 ) 的方法测定了提取物中的蛋白质的水平。

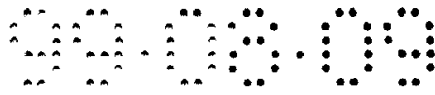
基本上按照 Steup ( 1990 ) 的方法, 进行了葡聚糖磷酸化酶活性的凝胶展开。在含有 1.5 % 糖原的天然聚丙烯酰胺凝胶 ( 8.5 % ) 上蛋白质被分开了。在 80 V 电泳 15 小时 ( 4  $^{\circ}$ C ) 之后, 将凝胶在 37  $^{\circ}$ C 在含有 20 mM 葡萄糖 - 1 - 磷酸和 0.05 % ( w/v ) 水解马铃薯淀粉的 0.1 M 柠檬酸 - NaOH 缓冲液 ( pH 6.0 ) 中温育 ( 1 - 2 小时 )。然后漂洗凝胶, 以碘溶液染色。为了蛋白质印迹分析, 如上所述使蛋白质在含糖原的聚丙烯酰胺凝胶上电泳。将蛋白质电印迹至硝酸纤维素膜, 以针对 GHTP 和 GLTP 产生的多克隆抗体对印迹进行探测。与偶联于抗兔第二抗体的碱性磷酸酶 ( Sigma ) 形成免疫印迹。

### H 薯片颜色测定

将 5 个表达 GLTP 反义序列的转基因马铃薯品系, 2 个表达 GHTP 反义序列的转基因品系, 非转基因 Desiree 对照品系, 以及 2 个以 pBI 121 载体 T - DNA 转化的对照品系, 在加拿大 Alberta 的田间条件下培植生长。块茎收获后贮存在 10  $^{\circ}$ C 和 4  $^{\circ}$ C。通过对每个品质的样品作中心切片, 在豆油中 205  $^{\circ}$ F 油炸约 3 分钟直至起泡为止, 对所有马铃薯品系的薯片颜色进行了测定。

### I 结果

从相同的栽培种 ( Desiree ), 相同的年龄, 以及在同样生长条件下并排生长的植株收获了所有的块茎。块茎的 RNA 印迹分析显示出在表达



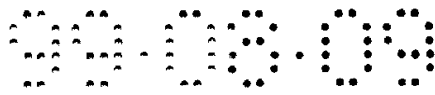
同源反义转录的转基因植株中，内源性 GLTP 转录有相当大的降低（图 5）。葡聚糖磷酸化酶测定显示，对于表达 GLTP 反义 DNA 的转基因植株，在收获时，以及在收获后至少 6 个月，其活性（ $\mu\text{mol NADPH}/\text{mg}$  蛋白质/小时）降低了（表 1）。制成表 1 的结果表明，相对于野生型对照株，对于各种转化的马铃薯品种，在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  贮存了 189 天的块茎中， $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶的活性降低了大约 16% - 70%。活性凝胶电泳和蛋白质印迹分析显示出同源酶特别低的表达，以及异源酶降低较少的表达（图 8）。对于同源产物的这种特异性，可能是由于磷酸化酶间的差异引起的（图 3 和 4）。

10 对收获时（0 天）的块茎分析表明，与对照块茎相比较，那些表达反义 GLTP 转录物的块茎具有低达 1/5 的还原糖（表 2）。而且， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  贮存 91 天后，与野生型对照株相比较，转化的块茎降低了 28 - 39% 的还原糖浓度。在表达反义 GLTP 转录物的块茎中，葡萄糖和果糖的浓度都显著降低了（表 3 和 4）。这些结果暗示，降低的 GLTP 活性减慢了  
15 块茎中淀粉变成还原性糖的分解代谢过程，而对照块茎中糖在持续地积累。总磷酸化酶活性和还原性糖之间的这种相互关系不是直接的，这表明在淀粉的分解代谢过程中某些磷酸化酶的同功酶可能起较重要的作用；与其它方式相比，降低表达特定磷酸化酶同功酶的特异性水平可能是比较最有利的方  
20 式；以及/或者可能还存在未发现的与还原糖水平降低有关的相互作用。

表达反义 GLTP 或 GHTP 转录物的转基因马铃薯植株已在田间条件下种植，并且它们的块茎贮存在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在冷贮存之前以及冷贮存 86 和 124 天之后，测定了与糖含量相关的薯片颜色。相对于在同样条件下贮存的对照块茎薯片颜色（较暗），来自表达反义 GLTP 转录物的所有转基因  
25 植株块茎的薯片颜色有显著的改善（较浅）（表 5 和图 7）。在分别在  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  贮存 86 天后，当用 Agtron E - 15 - FP 型直读式简易分光光度计（Agtron Inc. 1095 Spice Island Drive #100, Sparks Nevada 89431）测定时，来自表达 GLTP 转录物的“Desiree”马铃薯植株块茎的薯片记分改善了至少 4.3 个点和 8.9 个点。相对于野生型， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  贮存 124  
30 天后测定的 GLTP 转化体薯片记分改善了 44% - 89%（表 5）。

Desiree 栽培种不是用于薯片的商业上所希望的马铃薯，由它具有高





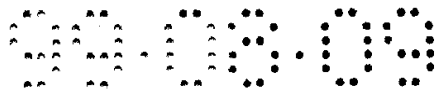
含量天然糖类，并且在冷贮存中倾向于迅速变甜。然而，使用转化的“Desiree”马铃薯，发现油炸薯片颜色有显著的改善。可以预料，如果将本发明的方法用于商业加工的马铃薯品种，将可获得优等浅色的薯片。

5 对贮存于 10 °C 和 4 °C 的块茎分析表明，那些表达反义 GHTP 转录物的块茎，有时可提供比对照块茎颜色浅的油炸薯片，指示有较低的还原糖积累(表 5)。显示异源性和同源性磷酸化酶活性降低的结果(图 8)指示，这种改善可能是一种或二种磷酸化酶活性降低的结果。但是，这些结果暗示，在淀粉变成还原糖的分解代谢中，L - 型磷酸化酶起重要的作用。

10 进而这些结果还表明，在野生型植株块茎和表达块茎磷酸化酶反义 RNA 的块茎之间，还原糖水平(表 2)和薯片记分(表 5)的差异，在长时间贮存过程中是持久的。如在表 5 中所示，在 86 天和 124 天薯片记分大致相同。在 4 °C 贮存 49 天和 91 天之后，还原糖浓度也未见进一步明显增加(表 2)。糖浓度的这种平均状态可能与块茎磷酸化酶的动力学有关。这种保持较低糖水平的能力，有可能使贮存期延长至少几个月。目前，待加工的马铃薯在 10 °C - 12 °C 通常最多只能贮存 3 - 6 个月，其后糖积累将达到降低品质的水平。必须进口新鲜的产品，直至可得到马铃薯的季节。延长马铃薯贮存期数月，可减少进口费用。

20 表 6 给出了一个改善百分数的概括结果，显示相对于未转化的对照植株，以来自 GLTP 基因序列(ATL 3 - ATL 9)，和 GHTP 基因序列(ATH 1，和 TH 2)的反义 DNA 转化的马铃薯植株的块茎，其各种改善的块茎冷贮存特征的改善百分数。从概括于表 6 中的结果表明，通过本发明的方法，可恒定地获得块茎冷贮存特征的重大改善。特别值得注意的，贮存于 4 °C 大约 4 个月(124 天)之后观察到的优于野生型的薯片记分百分数改善。观察到相对于野生型的薯片记分相对改善达到 89 %。改善的薯片记分反映出本发明的商业利用价值。也就是说，通过降低冷诱发的甜化，块茎可贮存于较冷的温度下，不会引起马铃薯油炸产品令人难以接受的变黑。

30 在收获时和贮存 91 天之后，相对于野生型转化的马铃薯品系糖积累减少，也证明本发明有显著的优点。糖积累降低与观察到的薯片记分改



善有关，并且还反映块茎比重的改善，这是块茎品质的另一个重要的测定指标。

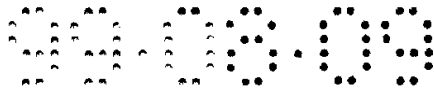
5 相对于野生型，转化的品系即使在收获时也观察到薯片记分和糖积累降低的重大改善。因此，本发明的好处不局限于仅仅延长冷贮存时间之后产生的改善，并且包括收获时出现的改善。在此意义上，本发明不仅仅局限于冷贮存特征的改善，并且包括块茎品质特征的改善，在收获时的薯片记分或糖积累，造成成熟较早。

再回到表 6 中概括的特定改善，可以看到，相对于野生型，在收获时，以及贮存 91 天和 189 天之后，GLTP 型转化体 (ATL 3 - ATL 9) 的  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶活性分别显示出达 66 %，70 % 和 69 % 的降低。相对于野生型在收获时以及贮存 91 天和 189 天之后，绝大多数也显示出超过 10 % 和 30 % 的改善。在贮存 91 天和 189 天之后，相对于野生型，GHTP - 型转化体 (ATH 1 和 ATH 2) 分别显示出达 28 % 和 39 % 的相对改善，一般表现出至少 10 % 的改善。

15 在收获时和 91 天后，相对于野生型，GLTP - 型转化体分别显示出达 80 % 和 39 % 的糖积累降低。在收获时，所有的 GLTP - 型转化体显示出至少 10 % 和至少 30 % 的相对改善。在 91 天，所有的 GLTP 型转化体显示出至少 10 % 的相对改善，绝大多数显示出至少 30 % 的相对改善。

20 在收获时以及贮存 86 天和 124 天之后，相对于野生型，GLTP - 型转化体分别显示出达 46 %，89 %，和 89 % 的薯片记分改善。在收获时以有贮存 86 天和 124 天之后，几乎全都显示出至少 10 % 和 30 % 的相对改善。在收获时以及贮存 86 天和 124 天之后，相对于野生型，至少一个 GHTP - 型转化体显示出至少 5 % 和至少 10 % 的改善。贮存 124 天之后，至少一个 GHTP - 型转化体显示出达 25 % 的薯片记分相对改善。

25 这些结果清楚地证明，通过本发明的方法，可容易地获得块茎冷贮存特征的重大改善。结果会有变，这是由于特别是重组的反义或有义 DNA 在植物基因组中插入的位置和存在的插入片段数目不同。重要的是，尽管在不同的转化品系中间，其结果存在易变性，但是在单一马铃薯转化品系中样品间的结果几乎没有改变 (见表 1 - 5 的附注)。对于所有用 GHTP 或 GLTP 反义 DNA 成功地转化的马铃薯植株品系，其结果显示在表 6 中。因此，所有的转化体都显示出一个或几个冷贮存特征的至少



某些改善，如薯片记分增加（烹调后颜色较淡）和糖积累降低，并且大多数显示出非常显著的改善。根据在此实施例中所见到的大部分阳性转化体，可以预料，应用本实施例中所述冷贮存特征测定程序，可容易地筛选出通过本发明方法转化的马铃薯植株，以便鉴别表现有冷贮存特征显著改善的转化品系。通过将在此公开的技术用于商业重要性的马铃薯品种，将可能容易地产生和选择出具有冷贮存特征显著改善的转化体。那些显示出优于野生型对照的最大相对改善的转化体，可用于发展新的商用马铃薯品种。

表 1

反义转录物对葡聚糖磷酸化酶活性的影响，对从田间生长的“Desiree”块茎的酶提取物测定结果。

葡聚糖磷酸酶活性					
在 4 °C 贮存的时间 (天)					
克隆	0	49	91	140	189
μmol NADPH/mg 蛋白质/小时					
Wt <sup>a</sup>	10.50	11.83	9.94	11.90	13.04
ATL 3	4.90	4.86	4.49	4.73	4.88
ATL 4	11.45	7.17	8.09	11.32	10.99
ATL 5	3.58	3.56	2.97	4.59	4.79
ATL 9	3.59	3.88	3.84	4.72	3.98
LSD <sub>0.05</sub> <sup>b</sup>	1.97	2.94	1.59	2.34	2.58
LSD <sub>0.01</sub>	2.87	4.28	2.31	3.41	3.75
克隆 <sup>c</sup>		0.01 <sup>d</sup>			
WT vs. ATL's		0.01			
天数		NS			
克隆 × 天数		0.05			
WT		11.49	8.90	12.66	13.66
ATH-1		10.40	9.69	10.79	10.10
ATH-2		6.46	6.40	6.56	8.38
LSD <sub>0.05</sub> <sup>b</sup>		2.02	0.41	3.00	NS
LSD <sub>0.01</sub>		4.78	0.95	NS	NS
克隆 <sup>c</sup>		0.01			
WT vs. ATL's		0.01			
天数		0.05			
克隆 × 天数		NS			

<sup>a</sup>WT, 未转化的野生型块茎。 <sup>b</sup>LSD, 对每种贮存时间在 0.05 或 0.01 水平的最小显著性差异。 <sup>c</sup>因子分析中变异的来源。 <sup>d</sup>指示变异来源的显著性水平。

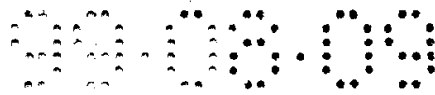


表 2  
反义 GLTP 转录物对田间生长的 Desiree  
块茎低温诱导的甜化的影响

克隆	还原性糖 (葡萄糖 + 蔗糖) 在 4 °C 贮存的时间 (天)		
	0	49	91
		mg/g 湿重	
Wt <sup>a</sup>	5.63	31.8	28.0
ATL 3	1.88	17.3	17.3
ATL 4	1.11	14.3	20.1
ATL 5	1.51	18.3	17.0
ATL 9	1.36	17.3	18.5
WT vs. ATL's <sup>b</sup>	0.01	0.01	0.05
克隆 <sup>c</sup>		0.01 <sup>d</sup>	
天数		0.01	
克隆 × 天数		NS	

<sup>a</sup>WT, 未转化的野生型块茎。

5 <sup>b</sup>LSD, 对每种贮存时间在 0.05 或 0.01 水平的最小显著性差异。

<sup>c</sup>因子分析中变异的来源。

<sup>d</sup>指示变异来源的显著性水平。

表 3  
反义 GLTP 转录物对田间生长的 Desiree  
块茎低温诱导的果糖积累的影响

克隆	果糖 在 4 °C 贮存时间 (天)		
	0	49	91
	mg/g 湿重		
Wt <sup>a</sup>	5.53	15.10	12.20
ATL 3	1.21	8.40	8.79
ATL 4	0.79	7.22	8.56
ATL 5	0.61	10.00	8.09
ATL 9	0.54	8.38	8.72
WT vs. ATL's <sup>b</sup>	0.01	0.01	NS
克隆 <sup>c</sup>		0.01 <sup>d</sup>	
天数		0.01	
克隆 × 天数		NS	

<sup>a</sup>WT, 未转化的野生型块茎。

5 <sup>b</sup>在每个贮存期间对 ANOVA 的垂直比较。

<sup>c</sup>因子分析中变异的来源。

<sup>d</sup>指示变异来源的显著性水平。

**表 4**  
反义 GLTP 转录物对田间生长的 “Desiree”  
块茎低温诱导的葡萄糖积累的影响

克隆	葡萄糖 在 4 °C 贮存的时间 (天)		
	0	49	91
		mg/g 湿重	
Wt <sup>a</sup>	2.10	16.60	15.90
ATL 3	0.68	8.94	8.49
ATL 4	0.32	7.07	11.06
ATL 5	1.05	8.33	8.91
ATL 9	0.83	8.87	9.78
WT vs. ATL's <sup>b</sup>	0.01	0.01	0.05
克隆 <sup>c</sup>		0.01 <sup>d</sup>	
天数		0.01	
克隆 × 天数		NS	

<sup>a</sup>WT, 未转化的野生型块茎。

5 <sup>b</sup>在每个贮存期间对 ANOVA 的垂直比较。

<sup>c</sup>因子分析中变异的来源。

<sup>d</sup>指示变异来源的显著性水平。



表 5

田间生长的“Desiree”块茎薯片平均颜色。为了测定油炸马铃薯片的颜色，使用类似于工业用的 Agtron 计进行薯片颜色分级测定。在此读数中，数值越大薯片产品颜色越浅，但颜色与读数不呈直线关系。

	收获	86 天	86 天	124 天
		10C	4C	4C
Wt <sup>a</sup>	26	25.3	15.4	17.1
ATL 3 <sup>c</sup>	25	37.4	26.7	30.8
ATL 4	35	43.7	29.1	32.3
ATL 5	36	29.6	24.7	24.6
ATL 9	38	38.7	24.3	26.6
ATH 1 <sup>d</sup>	26	49.7	17.5	21.4
ATH 2	29	31.2	15.6	15.9
GMP 1 <sup>e</sup>	31		15.7	15.7
GMP 2	35		16.7	16.6

5

<sup>a</sup>Agtron Inc. 1095 Spice Island Drive #100, Sparks Nevada 89431 .  
Agtron model E - 15 - EP 型 (直读式简易分光光度计)。以双光谱模式  
10 在红外和绿光附近测定反射率。结果是 6 - 8 个薯片的测定值。薯片来自 3 个直径约 3 - 4 cm 的随机选择的块茎。

<sup>b</sup>WT, 阴性对照, 野生型未转化的块茎。

<sup>c</sup>ATL, 用块茎 L - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶转化的块茎。

<sup>d</sup>ATH, 用块茎 H - 型  $\alpha$  葡聚糖磷酸化酶转化的块茎。

15 <sup>e</sup>GMP, 阴性对照, 用 pBI 121 T - DNA 转化的块茎。



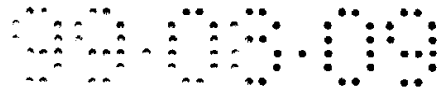
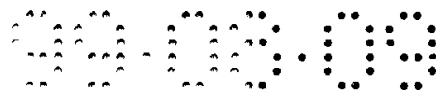


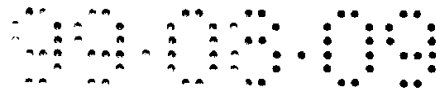
表 6  
结果摘要

样品	相对于野生型 $\alpha$ 葡聚糖磷酸化酶 活性降低的百分数			相对于野生 型糖积累降 低的百分数		相对于野生型 薯片记分改善 的百分数		
	收获时	91 天后	189 天后	收获时	91 天后	收获时	86 天后	124 天后
ATL 3	53	55	63	67	38	-4	73	80
ATL 4	-9	19	16	80	28	35	89	89
ATL 5	66	70	63	73	39	38	60	44
ATL 9	66	61	69	76	34	46	58	56
ATH 1	n/a	-9	26	n/a	n/a	0	14	25
ATH 2	n/a	28	39	n/a	n/a	12	1	-7

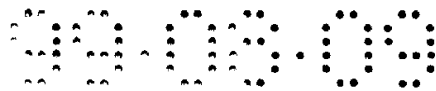


### 参考文献

- Alber 和 Kawasaki ( 1982 ) 分子及应用遗传学. 1: 419 - 434 .
- ap Rees et al. ( 1988 ) 实验生物学协会会志. 42: 377 - 393 .
- Bevan et al. ( 1983 ) 自然 ( 伦敦 ) 304: 184 - 187 .
- 5 Bevan et al. ( 1986 ) 核酸研究. 14 ( 11 ): 4625 - 4638 .
- Bimboim et al. ( 1979 ) 核酸研究. 7: 1513 - 1523 .
- Blennow et al. ( 1991 ) 植物化学 30: 437 - 444 .
- Bradford, M. M. 1976 . 应用蛋白染料结合原理定量测定微克量蛋白质的快速灵敏方法. 分析生物化学. 72: 243 - 254 .
- 10 Brisson et al. ( 1989 ) 植物细胞 1: 559 - 566 .
- Brusslan and Tobin ( 1995 ) 植物分子生物学 27: 809 - 813 .
- Burton, W. G. ( 1989 ) 马铃薯. Longman 科学和技术.
- Cannon et al. ( 1990 ) 植物分子生物学 15: 39 - 47
- Claassen et al. ( 1991 ) 植物生理学. 95: 1243 - 1249 .
- 15 Coffin et al. ( 1987 ) 食品科学. 52: 639 - 645 .
- Davies and Viola ( 1992 ) 秋后新闻和信息 3: 97 - 100 .
- De Block, M. ( 1988 ) 理论及应用遗传学 76: 767 - 774 .
- De Carvalho et al. ( 1992 ) EMBO J. 11: 2595 - 2602 .
- Depicker et al. ( 1982 ) 分子应用遗传学. 1: 561 - 573 .
- 20 Dixon et al. ( 1981 ) 植物化学 20: 969 - 972 .
- Dorlhac et al. 1994 分子及普通遗传学. 243: 613 - 621 .
- Ebbelaar et al. ( 1993 ) Int. Symp. on Gne. Manip. of Plant Metabolism and Growth, 29 - 31 March, Norwich UK 文摘
- Ecker and Davis ( 1986 ) 国家科学院学报 83: 5373 - 5376 .
- 25 Fling et al. ( 1985 ) 核酸研究 13 no. 19, 7095 - 7106 .
- Fraley, et al. ( 1983 ) 国家科学院学报 USA 80, 4803 - 4807 .
- Fraley et al. ( 1985 ) 生物/技术学 3, 629 - 635
- Fray and Grierson 1993 植物分子生物学 22: 589 - 602 .
- Gielen et al. ( 1984 ) EMBO J. 3: 835 - 846 .
- 30 Hasseloff, J. And W. L. Gerlach ( 1988 ) 自然 334: 585 - 591 .
- Hart et al. ( 1992 ) 分子及普通遗传学 235: 179 - 188 .



- Jorgensen. R. A. ( 1995 ) 科学 268 : 686 - 691 .
- Kawchuk et al. ( 1990 ) 分子植物微生物相互作用 3 : 301 - 307 .
- Kawchuk et al. ( 1991 ) 分子植物 - 微生物相互作用 4 : 247 - 253 .
- 5 Kay et al. ( 1987 ) 科学 236 : 1299 - 1302 .
- Kruger, N. J. and Hammond, J. B. W. ( 1988 ) 植物生理学 86 : 645 - 648 .
- Laemmli, U. K. ( 1970 ) 自然 ( 伦敦 ) 227 : 680 - 685 .
- Lin et al. ( 1988 ) 植物生理学 86 : 1131 - 1135 .
- 10 Loiselle et al. ( 1990 ) 美国马铃薯杂志 67 : 633 - 646 .
- Lynch et al. ( 1992 ) 加拿大植物科学杂志 72 : 535 - 543 .
- Matzke and Matzke ( 1995 ) 植物生理学 107 : 679 .
- Meyer and Saedler ( 1996 ) 植物生理学年评 47 : 23 - 48 .
- Mori et al. ( 1991 ) 生物化学杂志 266 : 18446 - 18453 .
- 15 Muller, et al. ( 1990 ) 分子基因遗传学 224 : 136 - 146 .
- Nakano et al. ( 1989 ) 生物化学杂志 106 : 691 - 695 .
- Nakano, K. and Fukui, T. ( 1986 ) 生物化学杂志 266 : 8230 - 8256 .
- Napoli et al. ( 1990 ) 植物细胞 2 : 279 - 289 .
- 20 Odell, et al. ( 1985 ) 自然 313 , 810 - 812 .
- Ohta et al. ( 1991 ) 分子及普通遗传学 225 : 369 - 378 .
- Ortiz, R. and Huaman, Z. ( 1994 ) 马铃薯遗传学 Bradshaw, J. E. and Mackay G. R. (des.)
- Sambrook et al. ( 1989 ) 分子克隆, 实验室手册 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- 25 Seymour et al. 1993 植物分子生物学 23 : 1 - 9 .
- Shahar et al. ( 1992 ) 植物细胞 4 : 135 - 147 .
- Shallenberger et al. ( 1959 ) 农业及食品化学 7 : 274 - 277 .
- Smith et al. ( 1988 ) 自然 334 : 724 - 726 .
- 30 Smith et al. ( 1990 ) 分子及普通遗传学。 244 : 447 - 481 .
- Sonnewald et al. ( 1995 ) 植物分子生物学 27 : 567 - 576 .



Sowokinos, J. (1990) 马铃薯分子和细胞生物学 M. A. Mayo and W. D. Parks (eds.).

Stalker et al. (1981) 分子及普通遗传学 181, 8 - 12.

Steup, M. (1990) 淀粉降解酶在“植物生物化学方法”中 Vol 3. P.

5 M. Dey and J. B. Harborne, eds. Academic Press, London

Stiekema et al. (1988) 植物分子生物学 11: 255 - 269.

Stukerlj et al. (1990) 核酸研究 18: 46050.

Takaha et al., (1993) 生物化学杂志 268: 1391 - 1396.

Thuring et al. (1975) 分析生物化学 66: 213 - 220.

10 Van der Krol et al (1988) 基因 72: 45 - 50.

Van der Krol (1990) 植物细胞 2: 291 - 299.

Weaver et al. (1978) 美国马铃薯杂志 55: 83 - 93.

Weintraub (1990) 科学美国人 1: 34 - 40.

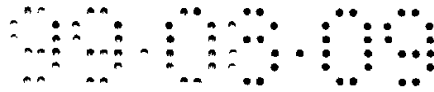
Winnacker, Ernst L. (1987) 从基因到克隆 VCH

15 Verlagsgesellschaft mbH. 联邦德国

Yoshida et al. (1992) Geneg 10: 255 - 259.

20 在此详述中所提到的所有文献都显示出本发明涉及的本领域技术水平。正如每篇单独的文献被特别地单独指明作为参考一样，在此将所有的文献引入作为参考。

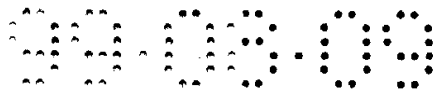
虽然上述发明通过以明确理解为目的的说明和实施例，在某种程度上已被详述，但是显然，在所附权利要求的范围内还可以实施某些变化和修改。



## 序列表

### ( 1 ) 一般信息:

- 5 ( i ) 申请人: **Her Majesty the Queen in Right of Canada as  
Represented by the Department of Agriculture  
and Agri - Food Canada**
- ( ii ) 发明名称: **具有改善品质特征的马铃薯及其生产方法**
- ( iii ) 序列数: **10**
- ( iv ) 通讯地址:
- 10 ( A ) 地址: **Mckay-Carey & Company**
- ( B ) 街道: **2125 Commerce Place, 10155-102nd Street**
- ( C ) 城市: **Edmonton**
- ( D ) 州: **Alberta**
- ( E ) 国家: **Canada**
- ( F ) 邮编: **T5J 4G8**
- 15 ( v ) 计算机可读形式:
- ( A ) 媒体类型: **软盘**
- ( B ) 计算机: **IBM PC 兼容机**
- ( C ) 操作系统: **PC - DOS/MS-DOS**
- ( D ) 软件: **PatentIn Release #1.0, Version #1.30**
- 20 ( vi ) 目前申请资料:
- ( A ) 申请号: **WO**
- ( B ) 申请日期: **10 - FEB - 1998**
- ( C ) 分类:
- ( vii ) 在先申请资料:
- 25 ( A ) 申请号: **US 60/036, 946**
- ( B ) 申请日期: **10 - FEB - 1997**
- ( vii ) 在先申请资料:
- ( A ) 申请号: **US 08/868, 786**
- ( B ) 申请日期: **04 - JUN - 1997**
- 30 ( viii ) 代理人/事务所信息:
- ( A ) 姓名: **Mckay-Carey, Mary Jane**



( B ) 注册号: 3790

( C ) 参考/文档号: 24002W00

( ix ) 电讯信息:

( A ) 电话: ( 403 ) 424 - 0222

5 ( B ) 电传: ( 403 ) 421 - 0834

( 2 ) SEQ ID NO: 1 信息:

( i ) 序列特征:

( A ) 长度: 3101 碱基对

( B ) 类型: 核酸

10 ( C ) 链型: 双链

( D ) 拓扑结构: 线性

( ii ) 分子类型: DNA ( 基因组的 )

( iii ) 假设: 无

( iv ) 反义: 无

15 ( vi ) 原始来源:

( A ) 生物体: *Solanum tuberosum*

( ix ) 特征:

( A ) 名称/要点: CDS

( B ) 定位: 44..2944

20 ( D ) 其它信息: /产物 = “马铃薯  $\alpha$  葡聚糖 L - 型块茎磷酸  
化酶”

( ix ) 特征:

( A ) 名称/要点: 成熟\_肽

( B ) 定位: 194..2941

25 ( ix ) 特征:

( A ) 名称/要点: 信号\_肽

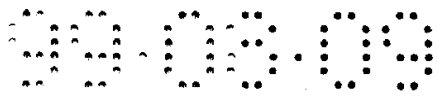
( B ) 定位: 44..193

( xi ) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

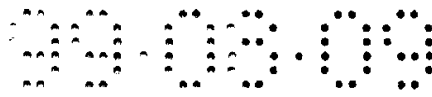
30 ATCACTCTCA TTCGAAAAGC TAGATTTGCA TAGAGAGCAC AAA ATG GCG ACT GCA  
Met Ala Thr Ala

55

-50

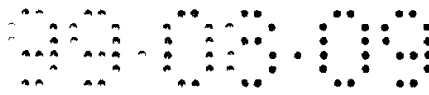


AAT GGA GCA CAC TTG TTC AAC CAT TAC AGC TCC AAT TCC AGA TTC ATC Asn Gly Ala His Leu Phe Asn His Tyr Ser Ser Asn Ser Arg Phe Ile -45 -40 -35	103
CAT TTC ACT TCT AGA AAC ACA AGC TCC AAA TTG TTC CTT ACC AAA ACC His Phe Thr Ser Arg Asn Thr Ser Ser Lys Leu Phe Leu Thr Lys Thr -30 -25 -20 -15	151
TCC CAT TTT CGG AGA CCC AAA CGC TGT TTC CAT GTC AAC AAT ACC TTG Ser His Phe Arg Arg Pro Lys Arg Cys Phe His Val Asn Asn Thr Leu -10 -5 1	199
AGT GAG AAA ATT CAC CAT CCC ATT ACT GAA CAA GGT GGT GAG AGC GAC Ser Glu Lys Ile His His Pro Ile Thr Glu Gln Gly Gly Glu Ser Asp 5 10 15	247
CTG AGT TCT TTT GCT CCT GAT GCC GCA TCT ATT ACC TCA AGT ATC AAA Leu Ser Ser Phe Ala Pro Asp Ala Ala Ser Ile Thr Ser Ser Ile Lys 20 25 30	295
TAC CAT GCA GAA TTC ACA CCT GTA TTC TCT CCT GAA AGG TTT GAG CTC Tyr His Ala Glu Phe Thr Pro Val Phe Ser Pro Glu Arg Phe Glu Leu 35 40 45 50	343
CCT AAG GCA TTC TTT GCA ACA GCT CAA AGT GTT CGT GAT TCG CTC CTT Pro Lys Ala Phe Phe Ala Thr Ala Gln Ser Val Arg Asp Ser Leu Leu 55 60 65	391
ATT AAT TGG AAT GCT ACG TAT GAT ATT TAT GAA AAG CTG AAC ATG AAG Ile Asn Trp Asn Ala Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Leu Asn Met Lys 70 75 80	439
CAA GCG TAC TAT CTA TCC ATG GAA TTT GTG CAG GGT AGA GCA TTG TTA Gln Ala Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Phe Leu Gln Gly Arg Ala Leu Leu 85 90 95	487
AAT GCA ATT GGT AAT CTG GAG CTT ACT GGT GCA TTT GCG GAA GCT TTG Asn Ala Ile Gly Asn Leu Glu Leu Thr Gly Ala Phe Ala Glu Ala Leu 100 105 110	535
AAA AAC CTT GGC CAC AAT CTA GAA AAT GTG GCT TCT CAG GAA CCA GAT Lys Asn Leu Gly His Asn Leu Glu Asn Val Ala Ser Gln Glu Pro Asp 115 120 125 130	583
GCT GCT CTT GGA AAT GGG GGT TTG GGA CGG CTT GCT TCC TGT TTT CTG Ala Ala Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg Leu Ala Ser Cys Phe Leu 135 140 145	631
GAC TCT TTG GCA ACA CTA AAC TAC CCA GCA TGG GGC TAT GGA CTT AGG Asp Ser Leu Ala Thr Leu Asn Tyr Pro Ala Trp Gly Tyr Gly Leu Arg 150 155 160	679
TAC AAG TAT GGT TTA TTT AAG CAA CGG ATT ACA AAA GAT GGT CAG GAG Tyr Lys Tyr Gly Leu Phe Lys Gln Arg Ile Thr Lys Asp Gly Gln Glu 165 170 175	727



GAG GTG GCT GAA GAT TGG CTT GAA ATT GGC AGT CCA TGG GAA GTT GTG Glu Val Ala Glu Asp Trp Leu Glu Ile Gly Ser Pro Trp Glu Val Val 180 185 190	775
AGG AAT GAT GTT TCA TAT CCT ATC AAA TTC TAT GGA AAA GTC TCT ACA Arg Asn Asp Val Ser Tyr Pro Ile Lys Phe Tyr Gly Lys Val Ser Thr 195 200 205 210	823
GGA TCA GAT GGA AAG AGG TAT TGG ATT GGT GGA GAG GAT ATA AAG GCA Gly Ser Asp Gly Lys Arg Tyr Trp Ile Gly Gly Glu Asp Ile Lys Ala 215 220 225	871
GTT GCG TAT GAT GTT CCC ATA CCA GGG TAT AAG ACC AGA ACC ACA ATC Val Ala Tyr Asp Val Pro Ile Pro Gly Tyr Lys Thr Arg Thr Thr Ile 230 235 240	919
AGC CTT CGA CTG TGG TCT ACA CAG GTT CCA TCA GCG GAT TTT GAT TTA Ser Leu Arg Leu Trp Ser Thr Gln Val Pro Ser Ala Asp Phe Asp Leu 245 250 255	967
TCT GCT TTC AAT GCT GGA GAG CAC ACC AAA GCA TGT GAA GCC CAA GCA Ser Ala Phe Asn Ala Gly Glu His Thr Lys Ala Cys Glu Ala Gln Ala 260 265 270	1015
AAC GCT GAG AAG ATA TGT TAC ATA CTC TAC CCT GGG GAT GAA TCA GAG Asn Ala Glu Lys Ile Cys Tyr Ile Leu Tyr Pro Gly Asp Glu Ser Glu 275 280 285 290	1063
GAG GGA AAG ATC CTT CGG TTG AAG CAA CAA TAT ACC TTA TGC TCG GCT Glu Gly Lys Ile Leu Arg Leu Lys Gln Gln Tyr Thr Leu Cys Ser Ala 295 300 305	1111
TCT CTC CAA GAT ATT ATT TCT CGA TTT GAG AGG AGA TCA GGT GAT CGT Ser Leu Gln Asp Ile Ile Ser Arg Phe Glu Arg Arg Ser Gly Asp Arg 310 315 320	1159
ATT AAG TGG GAA GAG TTT CCT GAA AAA GTT GCT GTG CAG ATG AAT GAC Ile Lys Trp Glu Glu Phe Pro Glu Lys Val Ala Val Gln Met Asn Asp 325 330 335	1207
ACT CAC CCT ACA CTT TGT ATC CCT GAG CTG ATG AGA ATA TTG ATA GAT Thr His Pro Thr Leu Cys Ile Pro Glu Leu Met Arg Ile Leu Ile Asp 340 345 350	1255
CTG AAG GGC TTG AAT TGG AAT GAA GCT TGG AAT ATT ACT CAA AGA ACT Leu Lys Gly Leu Asn Trp Asn Glu Ala Trp Asn Ile Thr Gln Arg Thr 355 360 365 370	1303
GTG GCC TAC ACA AAC CAT ACT GTT TTG CCT GAG GCA CTG GAG AAA TGG Val Ala Tyr Thr Asn His Thr Val Leu Pro Glu Ala Leu Glu Lys Trp 375 380 385	1351
AGT TAT GAA TTG ATG CAG AAA CTC CTT CCC AGA CAT GTC GAA ATC ATT Ser Tyr Glu Leu Met Gln Lys Leu Leu Pro Arg His Val Glu Ile Ile 390 395 400	1399





GAG GCG ATT GAC GAG GAG CTG GTA CAT GAA ATT GTA TTA AAA TAT GGT 1447  
Glu Ala Ile Asp Glu Glu Leu Val His Glu Ile Val Leu Lys Tyr Gly  
405 410 415

TCA ATG GAT CTG AAC AAA TTG GAG GAA AAG TTG ACT ACA ATG AGA ATC 1495  
Ser Met Asp Leu Asn Lys Leu Glu Glu Lys Leu Thr Thr Met Arg Ile  
420 425 430

TTA GAA AAT TTT GAT CTT CCC AGT TCT GTT GCT GAA TTA TTT ATT AAG 1543  
Leu Glu Asn Phe Asp Leu Pro Ser Ser Val Ala Glu Leu Phe Ile Lys  
435 440 445 450

CCT GAA ATC TCA GTT GAT GAT GAT ACT GAA ACA GTA GAA GTC CAT GAC 1591  
Pro Glu Ile Ser Val Asp Asp Asp Thr Glu Thr Val Glu Val His Asp  
455 460 465

AAA GTT GAA GCT TCC GAT AAA GTT GTG ACT AAT GAT GAA GAT GAC ACT 1639  
Lys Val Glu Ala Ser Asp Lys Val Val Thr Asn Asp Glu Asp Asp Thr  
470 475 480

GGT AAG AAA ACT AGT GTG AAG ATA GAA GCA GCT GCA GAA AAA GAC ATT 1687  
Gly Lys Lys Thr Ser Val Lys Ile Glu Ala Ala Ala Glu Lys Asp Ile  
485 490 495

GAC AAG AAA ACT CCC GTG AGT CCG GAA CCA GCT GTT ATA CCA CCT AAG 1735  
Asp Lys Lys Thr Pro Val Ser Pro Glu Pro Ala Val Ile Pro Pro Lys  
500 505 510

AAG GTA CGC ATG GCC AAC TTG TGT GTT GTG GGC GGC CAT GCT GTT AAT 1783  
Lys Val Arg Met Ala Asn Leu Cys Val Val Gly Gly His Ala Val Asn  
515 520 525 530

GGA GTT GCT GAG ATC CAT AGT GAA ATT GTG AAG GAG GAG GTT TTC AAT 1831  
Gly Val Ala Glu Ile His Ser Glu Ile Val Lys Glu Glu Val Phe Asn  
535 540 545

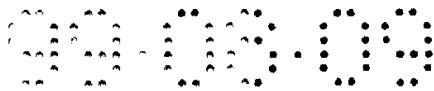
GAC TTC TAT GAG CTC TGG CCG GAA AAG TTC CAA AAC AAA ACA AAT GGA 1879  
Asp Phe Tyr Glu Leu Trp Pro Glu Lys Phe Gln Asn Lys Thr Asn Gly  
550 555 560

GTG ACT CCA AGA AGA TGG ATT CGT TTC TGC AAT CCT CCT CTT AGT GCC 1927  
Val Thr Pro Arg Arg Trp Ile Arg Phe Cys Asn Pro Pro Leu Ser Ala  
565 570 575

ATC ATA ACT AAG TGG ACT GGT ACA GAG GAT TGG GTC CTG AAA ACT GAA 1975  
Ile Ile Thr Lys Trp Thr Gly Thr Glu Asp Trp Val Leu Lys Thr Glu  
580 585 590

AAG TTG GCA GAA TTG CAG AAG TTT GCT GAT AAT GAA GAT CTT CAA AAT 2023  
Lys Leu Ala Glu Leu Gln Lys Phe Ala Asp Asn Glu Asp Leu Gln Asn  
595 600 605 610

GAG TGG AGG GAA GCA AAA AGG AGC AAC AAG ATT AAA GTT GTC TCC TTT 2071  
Glu Trp Arg Glu Ala Lys Arg Ser Asn Lys Ile Lys Val Val Ser Phe  
615 620 625



CTC AAA GAA AAG ACA GGG TAT TCT GTT GTC CCA GAT GCA ATG TTT GAT 2119  
Leu Lys Glu Lys Thr Gly Tyr Ser Val Val Pro Asp Ala Met Phe Asp  
630 635 640

ATT CAG GTA AAA CGC ATT CAT GAG TAC AAG CGA CAA CTG TTA AAT ATC 2167  
Ile Gln Val Lys Arg Ile His Glu Tyr Lys Arg Gln Leu Leu Asn Ile  
645 650 655

TTC GGC ATC GTT TAT CGG TAT AAG AAG ATG AAA GAA ATG ACA GCT GCA 2215  
Phe Gly Ile Val Tyr Arg Tyr Lys Lys Met Lys Glu Met Thr Ala Ala  
660 665 670

GAA AGA AAG ACT AAC TTC GTT CCT CGA GTA TGC ATA TTT GGG GGA AAA 2263  
Glu Arg Lys Thr Asn Phe Val Pro Arg Val Cys Ile Phe Gly Gly Lys  
675 680 685 690

GCT TTT GCC ACA TAT GTG CAA GCC AAG AGG ATT GTA AAA TTT ATC ACA 2311  
Ala Phe Ala Thr Tyr Val Gln Ala Lys Arg Ile Val Lys Phe Ile Thr  
695 700 705

GAT GTT GGT GCT ACT ATA AAT CAT GAT CCA GAA ATC GGT GAT CTG TTG 2359  
Asp Val Gly Ala Thr Ile Asn His Asp Pro Glu Ile Gly Asp Leu Leu  
710 715 720

AAG GTA GTC TTT GTG CCA GAT TAC AAT GTC AGT GTT GCT GAA TTG CTA 2407  
Lys Val Val Phe Val Pro Asp Tyr Asn Val Ser Val Ala Glu Leu Leu  
725 730 735

ATT CCT GCT AGC GAT CTA TCA GAA CAT ATC AGT ACG GCT GGA ATG GAG 2455  
Ile Pro Ala Ser Asp Leu Ser Glu His Ile Ser Thr Ala Gly Met Glu  
740 745 750

GCC AGT GGA ACC AGT AAT ATG AAG TTT GCA ATG AAT GGT TGT ATC CAA 2503  
Ala Ser Gly Thr Ser Asn Met Lys Phe Ala Met Asn Gly Cys Ile Gln  
755 760 765 770

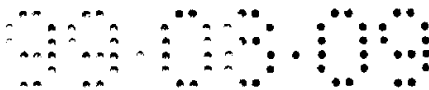
ATT GGT ACA TTG GAT GGC GCT AAT GTT GAA ATA AGG GAA GAG GTT GGA 2551  
Ile Gly Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val Glu Ile Arg Glu Glu Val Gly  
775 780 785

GAA GAA AAC TTC TTT CTC TTT GGT GCT CAA GCT CAT GAA ATT GCA GGG 2599  
Glu Glu Asn Phe Phe Leu Phe Gly Ala Gln Ala His Glu Ile Ala Gly  
790 795 800

CTT AGA AAA GAA AGA GCT GAC GGA AAG TTT GTA CCT GAT GAA CGT TTT 2647  
Leu Arg Lys Glu Arg Ala Asp Gly Lys Phe Val Pro Asp Glu Arg Phe  
805 810 815

GAA GAG GTG AAG GAA TTT GTT AGA AGC GGT GCT TTT GGC TCT TAT AAC 2695  
Glu Glu Val Lys Glu Phe Val Arg Ser Gly Ala Phe Gly Ser Tyr Asn  
820 825 830

TAT GAT GAC CTA ATT GGA TCG TTG GAA GGA AAT GAA GGT TTT GGC CGT 2743  
Tyr Asp Asp Leu Ile Gly Ser Leu Glu Gly Asn Glu Gly Phe Gly Arg  
835 840 845 850



GCT GAC TAT TTC CTT GTG GGC AAG GAC TTC CCC AGT TAC ATA GAA TGC 2791  
Ala Asp Tyr Phe Leu Val Gly Lys Asp Phe Pro Ser Tyr Ile Glu Cys  
855 860 865

CAA GAG AAA GTT GAT GAG GCA TAT CGC GAC CAG AAA AGG TGG ACA ACG 2839  
Gln Glu Lys Val Asp Glu Ala Tyr Arg Asp Gln Lys Arg Trp Thr Thr  
870 875 880

5 ATG TCA ATC TTG AAT ACA GCG GGA TCG TAC AAG TTC AGC AGT GAC AGA 2887  
Met Ser Ile Leu Asn Thr Ala Gly Ser Tyr Lys Phe Ser Ser Asp Arg  
885 890 895

ACA ATC CAT GAA TAT GCC AAA GAC ATT TGG AAC ATT GAA GCT GTG GAA 2935  
Thr Ile His Glu Tyr Ala Lys Asp Ile Trp Asn Ile Glu Ala Val Glu  
900 905 910

10 ATA GCA TAA GAGGGGGAAG TGAATGAAAA ATAACAAAGG CACAGTAAGT 2984  
Ile Ala \*  
915

AGTTTCTCTT TTTATCATGT GATGAAGGTA TATAATGTAT GTGTAAGAGG ATGATGTTAT 3044

TACCACATAA TAAGAGATGA AGAGTCTCAT TTTGCTTCAA AAAAAAAAAA AAAAAAA 3101

15 (2) SEQ ID NO: 2 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 967 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

20 (ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Thr Ala Asn Gly Ala His Leu Phe Asn His Tyr Ser Ser Asn  
-50 -45 -40 -35

Ser Arg Phe Ile His Phe Thr Ser Arg Asn Thr Ser Ser Lys Leu Phe  
-30 -25 -20

Leu Thr Lys Thr Ser His Phe Arg Arg Pro Lys Arg Cys Phe His Val  
-15 -10 -5

Asn Asn Thr Leu Ser Glu Lys Ile His His Pro Ile Thr Glu Gln Gly  
1 5 10

Gly Glu Ser Asp Leu Ser Ser Phe Ala Pro Asp Ala Ala Ser Ile Thr  
15 20 25 30



Ser Ser Ile Lys Tyr His Ala Glu Phe Thr Pro Val Phe Ser Pro Glu  
35 40 45

Arg Phe Glu Leu Pro Lys Ala Phe Phe Ala Thr Ala Gln Ser Val Arg  
50 55 60

Asp Ser Leu Leu Ile Asn Trp Asn Ala Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys  
65 70 75

Leu Asn Met Lys Gln Ala Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Phe Leu Gln Gly  
80 85 90

Arg Ala Leu Leu Asn Ala Ile Gly Asn Leu Glu Leu Thr Gly Ala Phe  
95 100 105 110

Ala Glu Ala Leu Lys Asn Leu Gly His Asn Leu Glu Asn Val Ala Ser  
115 120 125

Gln Glu Pro Asp Ala Ala Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg Leu Ala  
130 135 140

Ser Cys Phe Leu Asp Ser Leu Ala Thr Leu Asn Tyr Pro Ala Trp Gly  
145 150 155

Tyr Gly Leu Arg Tyr Lys Tyr Gly Leu Phe Lys Gln Arg Ile Thr Lys  
160 165 170

Asp Gly Gln Glu Glu Val Ala Glu Asp Trp Leu Glu Ile Gly Ser Pro  
175 180 185 190

Trp Glu Val Val Arg Asn Asp Val Ser Tyr Pro Ile Lys Phe Tyr Gly  
195 200 205

Lys Val Ser Thr Gly Ser Asp Gly Lys Arg Tyr Trp Ile Gly Gly Glu  
210 215 220

Asp Ile Lys Ala Val Ala Tyr Asp Val Pro Ile Pro Gly Tyr Lys Thr  
225 230 235

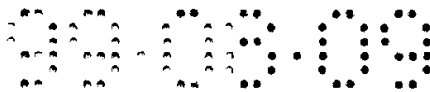
Arg Thr Thr Ile Ser Leu Arg Leu Trp Ser Thr Gln Val Pro Ser Ala  
240 245 250

Asp Phe Asp Leu Ser Ala Phe Asn Ala Gly Glu His Thr Lys Ala Cys  
255 260 265 270

Glu Ala Gln Ala Asn Ala Glu Lys Ile Cys Tyr Ile Leu Tyr Pro Gly  
275 280 285

Asp Glu Ser Glu Glu Gly Lys Ile Leu Arg Leu Lys Gln Gln Tyr Thr  
290 295 300

Leu Cys Ser Ala Ser Leu Gln Asp Ile Ile Ser Arg Phe Glu Arg Arg  
305 310 315



Ser Gly Asp Arg Ile Lys Trp Glu Glu Phe Pro Glu Lys Val Ala Val  
320 325 330

Gln Met Asn Asp Thr His Pro Thr Leu Cys Ile Pro Glu Leu Met Arg  
335 340 345 350

Ile Leu Ile Asp Leu Lys Gly Leu Asn Trp Asn Glu Ala Trp Asn Ile  
355 360 365

Thr Gln Arg Thr Val Ala Tyr Thr Asn His Thr Val Leu Pro Glu Ala  
370 375 380

Leu Glu Lys Trp Ser Tyr Glu Leu Met Gln Lys Leu Leu Pro Arg His  
385 390 395

Val Glu Ile Ile Glu Ala Ile Asp Glu Glu Leu Val His Glu Ile Val  
400 405 410

Leu Lys Tyr Gly Ser Met Asp Leu Asn Lys Leu Glu Glu Lys Leu Thr  
415 420 425 430

Thr Met Arg Ile Leu Glu Asn Phe Asp Leu Pro Ser Ser Val Ala Glu  
435 440 445

Leu Phe Ile Lys Pro Glu Ile Ser Val Asp Asp Asp Thr Glu Thr Val  
450 455 460

Glu Val His Asp Lys Val Glu Ala Ser Asp Lys Val Val Thr Asn Asp  
465 470 475

Glu Asp Asp Thr Gly Lys Lys Thr Ser Val Lys Ile Glu Ala Ala Ala  
480 485 490

Glu Lys Asp Ile Asp Lys Lys Thr Pro Val Ser Pro Glu Pro Ala Val  
495 500 505 510

Ile Pro Pro Lys Lys Val Arg Met Ala Asn Leu Cys Val Val Gly Gly  
515 520 525

His Ala Val Asn Gly Val Ala Glu Ile His Ser Glu Ile Val Lys Glu  
530 535 540

Glu Val Phe Asn Asp Phe Tyr Glu Leu Trp Pro Glu Lys Phe Gln Asn  
545 550 555

Lys Thr Asn Gly Val Thr Pro Arg Arg Trp Ile Arg Phe Cys Asn Pro  
560 565 570

Pro Leu Ser Ala Ile Ile Thr Lys Trp Thr Gly Thr Glu Asp Trp Val  
575 580 585 590

Leu Lys Thr Glu Lys Leu Ala Glu Leu Gln Lys Phe Ala Asp Asn Glu  
595 600 605



Asp Leu Gln Asn Glu Trp Arg Glu Ala Lys Arg Ser Asn Lys Ile Lys  
610 615 620

Val Val Ser Phe Leu Lys Glu Lys Thr Gly Tyr Ser Val Val Pro Asp  
625 630 635

Ala Met Phe Asp Ile Gln Val Lys Arg Ile His Glu Tyr Lys Arg Gln  
640 645 650

Leu Leu Asn Ile Phe Gly Ile Val Tyr Arg Tyr Lys Lys Met Lys Glu  
655 660 665 670

Met Thr Ala Ala Glu Arg Lys Thr Asn Phe Val Pro Arg Val Cys Ile  
675 680 685

Phe Gly Gly Lys Ala Phe Ala Thr Tyr Val Gln Ala Lys Arg Ile Val  
690 695 700

Lys Phe Ile Thr Asp Val Gly Ala Thr Ile Asn His Asp Pro Glu Ile  
705 710 715

Gly Asp Leu Leu Lys Val Val Phe Val Pro Asp Tyr Asn Val Ser Val  
720 725 730

Ala Glu Leu Leu Ile Pro Ala Ser Asp Leu Ser Glu His Ile Ser Thr  
735 740 745 750

Ala Gly Met Glu Ala Ser Gly Thr Ser Asn Met Lys Phe Ala Met Asn  
755 760 765

Gly Cys Ile Gln Ile Gly Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val Glu Ile Arg  
770 775 780

Glu Glu Val Gly Glu Glu Asn Phe Phe Leu Phe Gly Ala Gln Ala His  
785 790 795

Glu Ile Ala Gly Leu Arg Lys Glu Arg Ala Asp Gly Lys Phe Val Pro  
800 805 810

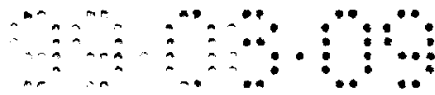
Asp Glu Arg Phe Glu Glu Val Lys Glu Phe Val Arg Ser Gly Ala Phe  
815 820 825 830

Gly Ser Tyr Asn Tyr Asp Asp Leu Ile Gly Ser Leu Glu Gly Asn Glu  
835 840 845

Gly Phe Gly Arg Ala Asp Tyr Phe Leu Val Gly Lys Asp Phe Pro Ser  
850 855 860

Tyr Ile Glu Cys Gln Glu Lys Val Asp Glu Ala Tyr Arg Asp Gln Lys  
865 870 875

Arg Trp Thr Thr Met Ser Ile Leu Asn Thr Ala Gly Ser Tyr Lys Phe  
880 885 890



Ser Ser Asp Arg Thr Ile His Glu Tyr Ala Lys Asp Ile Trp Asn Ile  
 895 900 905 910

Glu Ala Val Glu Ile Ala \*  
 915

5 (2) SEQ ID NO: 3 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 2655 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

10 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(vi) 原始来源:

15 (A) 生物体: Solanum tuberosum

(ix) 特征:

(A) 名称/要点: CDS

(B) 定位: 12..2528

20 (D) 其它信息: /产物 = “马铃薯 α 葡聚糖 H - 型块茎磷酸化酶”

(ix) 特征:

(A) 名称/要点: 成熟\_肽

(B) 定位: 12..2525

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

```

GTTTATTTTC C ATG GAA GGT GGT GCA AAA TCG AAT GAT GTA TCA GCA GCA      50
      Met Glu Gly Gly Ala Lys Ser Asn Asp Val Ser Ala Ala
          1                5                10

CCT ATT GCT CAA CCA CTT TCT GAA GAC CCT ACT GAC ATT GCA TCT AAT      98
Pro Ile Ala Gln Pro Leu Ser Glu Asp Pro Thr Asp Ile Ala Ser Asn
      15                20                25

ATC AAG TAT CAT GCT CAA TAT ACT CCT CAT TTT TCT CCT TTC AAG TTT      146
Ile Lys Tyr His Ala Gln Tyr Thr Pro His Phe Ser Pro Phe Lys Phe
      30                35                40                45
  
```



GAG CCA CTA CAA GCA TAC TAT GCT GCT ACT GCT GAC AGT GTT CGT GAT	194
Glu Pro Leu Gln Ala Tyr Tyr Ala Ala Thr Ala Asp Ser Val Arg Asp	
50 55 60	
CGC TTG ATC AAA CAA TGG AAT GAC ACC TAT CTT CAT TAT GAC AAA GTT	242
Arg Leu Ile Lys Gln Trp Asn Asp Thr Tyr Leu His Tyr Asp Lys Val	
65 70 75	
AAT CCA AAG CAA ACA TAC TAC TTA TCA ATG GAG TAT CTC CAG GGG CGA	290
Asn Pro Lys Gln Thr Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Tyr Leu Gln Gly Arg	
80 85 90	
GCT TTG ACA AAT GCA GTT GGA AAC TTA GAC ATC CAC AAT GCA TAT GCT	338
Ala Leu Thr Asn Ala Val Gly Asn Leu Asp Ile His Asn Ala Tyr Ala	
95 100 105	
GAT GCT TTA AAC AAA CTG GGT CAG CAG CTT GAG GAG GTC GTT GAG CAG	386
Asp Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gln Gln Leu Glu Glu Val Val Glu Gln	
110 115 120 125	
GAA AAA GAT GCA GCA TTA GGA AAT GGT GGT TTA GGA AGG CTC GCT TCA	434
Glu Lys Asp Ala Ala Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg Leu Ala Ser	
130 135 140	
TGC TTT CTT GAT TCC ATG GCC ACA TTG AAC CTT CCA GCA TGG GGT TAT	482
Cys Phe Leu Asp Ser Met Ala Thr Leu Asn Leu Pro Ala Trp Gly Tyr	
145 150 155	
GGC TTG AGG TAC AGA TAT GGA CTT TTT AAG CAG CTT ATC ACA AAG GCT	530
Gly Leu Arg Tyr Arg Tyr Gly Leu Phe Lys Gln Leu Ile Thr Lys Ala	
160 165 170	
GGG CAA GAA GAA GTT CCT GAA GAT TGG TTG GAG AAA TTT AGT CCC TGG	578
Gly Gln Glu Glu Val Pro Glu Asp Trp Leu Glu Lys Phe Ser Pro Trp	
175 180 185	
GAA ATT GTA AGG CAT GAT GTT GTC TTT CCT ATC AGG TTT TTT GGT CAT	626
Glu Ile Val Arg His Asp Val Val Phe Pro Ile Arg Phe Phe Gly His	
190 195 200 205	
GTT GAA GTC CTC CCT TCT GGC TCG CGA AAA TGG GTT GGT GGA GAG GTC	674
Val Glu Val Leu Pro Ser Gly Ser Arg Lys Trp Val Gly Gly Glu Val	
210 215 220	
CTA CAG GCT CTT GCA TAT GAT GTG CCA ATT CCA GGA TAC AGA ACT AAA	722
Leu Gln Ala Leu Ala Tyr Asp Val Pro Ile Pro Gly Tyr Arg Thr Lys	
225 230 235	
AAC ACT AAT AGT CTT CGT CTC TGG GAA GCC AAA GCA AGC TCT GAG GAT	770
Asn Thr Asn Ser Leu Arg Leu Trp Glu Ala Lys Ala Ser Ser Glu Asp	
240 245 250	
TTC AAC TTG TTT CTG TTT AAT GAT GGA CAG TAT GAT GCT GCT GCA CAG	818
Phe Asn Leu Phe Leu Phe Asn Asp Gly Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln	
255 260 265	





CTT CAT TCT AGG GCT CAG CAG ATT TGT GCT GTT CTC TAC CCT GGG GAT 866  
Leu His Ser Arg Ala Gln Gln Ile Cys Ala Val Leu Tyr Pro Gly Asp  
270 275 280 285

GCT ACA GAG AAT GGA AAA CTC TTA CGG CTA AAG CAA CAA TTT TTT CTG 914  
Ala Thr Glu Asn Gly Lys Leu Leu Arg Leu Lys Gln Gln Phe Phe Leu  
290 295 300

TGC AGT GCA TCG CTT CAG GAT ATT ATT GCC AGA TTC AAA GAG AGA GAA 962  
Cys Ser Ala Ser Leu Gln Asp Ile Ile Ala Arg Phe Lys Glu Arg Glu  
305 310 315

GAT GGA AAG GGT TCT CAC CAG TGG TCT GAA TTC CCC AAG AAG GTT GCG 1010  
Asp Gly Lys Gly Ser His Gln Trp Ser Glu Phe Pro Lys Lys Val Ala  
320 325 330

ATA CAA CTA AAT GAC ACA CAT CCA ACT CTT ACG ATT CCA GAG CTG ATG 1058  
Ile Gln Leu Asn Asp Thr His Pro Thr Leu Thr Ile Pro Glu Leu Met  
335 340 345

CGG TTG CTA ATG GAT GAT GAA GGA CTT GGG TGG GAT GAA TCT TGG AAT 1106  
Arg Leu Leu Met Asp Asp Glu Gly Leu Gly Trp Asp Glu Ser Trp Asn  
350 355 360 365

ATC ACT ACT AGG ACA ATT GCC TAT ACG AAT CAT ACA GTC CTA CCT GAA 1154  
Ile Thr Thr Arg Thr Ile Ala Tyr Thr Asn His Thr Val Leu Pro Glu  
370 375 380

GCA CTT GAA AAA TGG TCT CAG GCA GTC ATG TGG AAG CTC CTT CCT AGA 1202  
Ala Leu Glu Lys Trp Ser Gln Ala Val Met Trp Lys Leu Leu Pro Arg  
385 390 395

CAT ATG GAA ATC ATT GAA GAA ATT GAC AAA CGG TTT GTT GCT ACA ATA 1250  
His Met Glu Ile Ile Glu Glu Ile Asp Lys Arg Phe Val Ala Thr Ile  
400 405 410

ATG TCA GAA AGA CCT GAT CTT GAG AAT AAG ATG CCT AGC ATG CGC ATT 1298  
Met Ser Glu Arg Pro Asp Leu Glu Asn Lys Met Pro Ser Met Arg Ile  
415 420 425

TTG GAT CAC AAC GCC ACA AAA CCT GTT GTG CAT ATG GCT AAC TTG TGT 1346  
Leu Asp His Asn Ala Thr Lys Pro Val Val His Met Ala Asn Leu Cys  
430 435 440 445

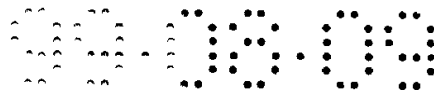
GTT GTC TCT TCA CAT ACG GTA AAT GGT GTT GCC CAG CTG CAT AGT GAC 1394  
Val Val Ser Ser His Thr Val Asn Gly Val Ala Gln Leu His Ser Asp  
450 455 460

ATC CTG AAG GCT GAG TTA TTT GCT GAT TAT GTC TCT GTA TGG CCC ACC 1442  
Ile Leu Lys Ala Glu Leu Phe Ala Asp Tyr Val Ser Val Trp Pro Thr  
465 470 475

AAG TTC CAG AAT AAG ACC AAT GGT ATA ACT CCT CGT AGG TGG ATC CGA 1490  
Lys Phe Gln Asn Lys Thr Asn Gly Ile Thr Pro Arg Arg Trp Ile Arg  
480 485 490



TTT TGT AGT CCT GAG CTG AGT CAT ATA ATT ACC AAG TGG TTA AAA ACA Phe Cys Ser Pro Glu Leu Ser His Ile Ile Thr Lys Trp Leu Lys Thr 495 500 505	1538
GAT CAA TGG GTG ACG AAC CTC GAA CTG CTT GCT AAT CTT CGG GAG TTT Asp Gln Trp Val Thr Asn Leu Glu Leu Leu Ala Asn Leu Arg Glu Phe 510 515 520 525	1586
GCT GAT AAT TCG GAG CTC CAT GCT GAA TGG GAA TCA GCC AAG ATG GCC Ala Asp Asn Ser Glu Leu His Ala Glu Trp Glu Ser Ala Lys Met Ala 530 535 540	1634
AAC AAG CAG CGT TTG GCA CAG TAT ATA CTG CAT GTG ACA GGT GTG AGC Asn Lys Gln Arg Leu Ala Gln Tyr Ile Leu His Val Thr Gly Val Ser 545 550 555	1682
ATC GAT CCA AAT TCC CTT TTT GAC ATA CAA GTC AAA CGT ATC CAT GAA Ile Asp Pro Asn Ser Leu Phe Asp Ile Gln Val Lys Arg Ile His Glu 560 565 570	1730
TAC AAA AGG CAG CTT CTA AAT ATT CTG GGC GTC ATC TAT AGA TAC AAG Tyr Lys Arg Gln Leu Leu Asn Ile Leu Gly Val Ile Tyr Arg Tyr Lys 575 580 585	1778
AAG CTT AAG GGA ATG AGC CCT GAA GAA AGG AAA AAT ACA ACT CCT CGC Lys Leu Lys Gly Met Ser Pro Glu Glu Arg Lys Asn Thr Thr Pro Arg 590 595 600 605	1826
ACA GTC ATG ATT GGA GGA AAA GCA TTT GCA ACA TAC ACA AAT GCA AAA Thr Val Met Ile Gly Gly Lys Ala Phe Ala Thr Tyr Thr Asn Ala Lys 610 615 620	1874
CGA ATT GTC AAG CTC GTG ACT GAT GTT GGC GAC GTT GTC AAT AGT GAC Arg Ile Val Lys Leu Val Thr Asp Val Gly Asp Val Val Asn Ser Asp 625 630 635	1922
CCT GAC GTC AAT GAC TAT TTG AAG GTG GTT TTT GTT CCC AAC TAC AAT Pro Asp Val Asn Asp Tyr Leu Lys Val Val Phe Val Pro Asn Tyr Asn 640 645 650	1970
GTA TCT GTG GCA GAG ATG CTT ATT CCG GGA AGT GAG CTA TCA CAA CAC Val Ser Val Ala Glu Met Leu Ile Pro Gly Ser Glu Leu Ser Gln His 655 660 665	2018
ATC AGT ACT GCA GGC ATG GAA GCA AGT GGA ACA AGC AAC ATG AAA TTT Ile Ser Thr Ala Gly Met Glu Ala Ser Gly Thr Ser Asn Met Lys Phe 670 675 680 685	2066
GCC CTT AAT GGA TGC CTT ATC ATT GGG ACA CTA GAT GGG GCC AAT GTG Ala Leu Asn Gly Cys Leu Ile Ile Gly Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val 690 695 700	2114
GAA ATT AGG GAG GAA ATT GGA GAA GAT AAC TTC TTT CTT TTT GGT GCA Glu Ile Arg Glu Glu Ile Gly Glu Asp Asn Phe Phe Leu Phe Gly Ala 705 710 715	2162



	ACA GCT GAT GAA GTT CCT CAA CTG CGC AAA GAT CGA GAG AAT GGA CTG	2210
	Thr Ala Asp Glu Val Pro Gln Leu Arg Lys Asp Arg Glu Asn Gly Leu	
	720 725 730	
5	TTC AAA CCT GAT CCT CGG TTT GAA GAG GCA AAA CAA TTT ATT AGG TCT	2258
	Phe Lys Pro Asp Pro Arg Phe Glu Glu Ala Lys Gln Phe Ile Arg Ser	
	735 740 745	
	GGA GCA TTT GGG ACG TAT GAT TAT AAT CCC CTC CTT GAA TCA CTG GAA	2306
	Gly Ala Phe Gly Thr Tyr Asp Tyr Asn Pro Leu Leu Glu Ser Leu Glu	
	750 755 760 765	
	GGG AAC TCG GGA TAT GGT CGT GGA GAC TAT TTT CTT GTT GGT CAT GAT	2354
	Gly Asn Ser Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Tyr Phe Leu Val Gly His Asp	
	770 775 780	
10	TTT CCG AGC TAC ATG GAT GCT CAG GCA AGG GTT GAT GAA GCT TAC AAG	2402
	Phe Pro Ser Tyr Met Asp Ala Gln Ala Arg Val Asp Glu Ala Tyr Lys	
	785 790 795	
	GAC AGG AAA AGA TGG ATA AAG ATG TCT ATA CTG AGC ACT AGT GGG AGT	2450
	Asp Arg Lys Arg Trp Ile Lys Met Ser Ile Leu Ser Thr Ser Gly Ser	
	800 805 810	
15	GGC AAA TTT AGT AGT GAC CGT ACA ATT TCT CAA TAT GCA AAA GAG ATC	2498
	Gly Lys Phe Ser Ser Asp Arg Thr Ile Ser Gln Tyr Ala Lys Glu Ile	
	815 820 825	
	TGG AAC ATT GCC GAG TGT CGC GTG CCT TGA GCACACTTCT GAACCTGGTA	2548
	Trp Asn Ile Ala Glu Cys Arg Val Pro *	
	830 835	
	TCTAATAAGG ATCTAATGTT CATTGTTTAC TAGCATATGA ATAATGTAAG TTCAAGCACA	2608
20	ACATGCTTTC TTATTTCCCTA CTGCTCTCAA GAAGCAGTTA TTTGTTG	2655

( 2 ) SEQ ID NO : 4 信息:

( i ) 序列特征:

( A ) 长度: 839 个氨基酸

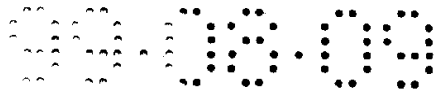
( B ) 类型: 氨基酸

( D ) 拓扑结构: 线性

( ii ) 分子类型: 蛋白质

( xi ) 序列描述: SEQ ID NO : 4:

Met	Glu	Gly	Gly	Ala	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ile	Ala
1				5					10					15	
Gln	Pro	Leu	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Asp	Ile	Ala	Ser	Asn	Ile	Lys	Tyr
			20					25					30		



His Ala Gln Tyr Thr Pro His Phe Ser Pro Phe Lys Phe Glu Pro Leu  
35 40 45

Gln Ala Tyr Tyr Ala Ala Thr Ala Asp Ser Val Arg Asp Arg Leu Ile  
50 55 60

Lys Gln Trp Asn Asp Thr Tyr Leu His Tyr Asp Lys Val Asn Pro Lys  
65 70 75 80

Gln Thr Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Tyr Leu Gln Gly Arg Ala Leu Thr  
85 90 95

Asn Ala Val Gly Asn Leu Asp Ile His Asn Ala Tyr Ala Asp Ala Leu  
100 105 110

Asn Lys Leu Gly Gln Gln Leu Glu Glu Val Val Glu Gln Glu Lys Asp  
115 120 125

Ala Ala Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg Leu Ala Ser Cys Phe Leu  
130 135 140

Asp Ser Met Ala Thr Leu Asn Leu Pro Ala Trp Gly Tyr Gly Leu Arg  
145 150 155 160

Tyr Arg Tyr Gly Leu Phe Lys Gln Leu Ile Thr Lys Ala Gly Gln Glu  
165 170 175

Glu Val Pro Glu Asp Trp Leu Glu Lys Phe Ser Pro Trp Glu Ile Val  
180 185 190

Arg His Asp Val Val Phe Pro Ile Arg Phe Phe Gly His Val Glu Val  
195 200 205

Leu Pro Ser Gly Ser Arg Lys Trp Val Gly Gly Glu Val Leu Gln Ala  
210 215 220

Leu Ala Tyr Asp Val Pro Ile Pro Gly Tyr Arg Thr Lys Asn Thr Asn  
225 230 235 240

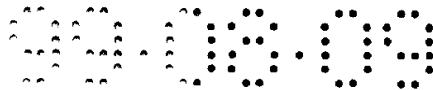
Ser Leu Arg Leu Trp Glu Ala Lys Ala Ser Ser Glu Asp Phe Asn Leu  
245 250 255

Phe Leu Phe Asn Asp Gly Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Leu His Ser  
260 265 270

Arg Ala Gln Gln Ile Cys Ala Val Leu Tyr Pro Gly Asp Ala Thr Glu  
275 280 285

Asn Gly Lys Leu Leu Arg Leu Lys Gln Gln Phe Phe Leu Cys Ser Ala  
290 295 300

Ser Leu Gln Asp Ile Ile Ala Arg Phe Lys Glu Arg Glu Asp Gly Lys  
305 310 315 320



Gly Ser His Gln Trp Ser Glu Phe Pro Lys Lys Val Ala Ile Gln Leu  
325 330 335

Asn Asp Thr His Pro Thr Leu Thr Ile Pro Glu Leu Met Arg Leu Leu  
340 345 350

Met Asp Asp Glu Gly Leu Gly Trp Asp Glu Ser Trp Asn Ile Thr Thr  
355 360 365

Arg Thr Ile Ala Tyr Thr Asn His Thr Val Leu Pro Glu Ala Leu Glu  
370 375 380

Lys Trp Ser Gln Ala Val Met Trp Lys Leu Leu Pro Arg His Met Glu  
385 390 395 400

Ile Ile Glu Glu Ile Asp Lys Arg Phe Val Ala Thr Ile Met Ser Glu  
405 410 415

Arg Pro Asp Leu Glu Asn Lys Met Pro Ser Met Arg Ile Leu Asp His  
420 425 430

Asn Ala Thr Lys Pro Val Val His Met Ala Asn Leu Cys Val Val Ser  
435 440 445

Ser His Thr Val Asn Gly Val Ala Gln Leu His Ser Asp Ile Leu Lys  
450 455 460

Ala Glu Leu Phe Ala Asp Tyr Val Ser Val Trp Pro Thr Lys Phe Gln  
465 470 475 480

Asn Lys Thr Asn Gly Ile Thr Pro Arg Arg Trp Ile Arg Phe Cys Ser  
485 490 495

Pro Glu Leu Ser His Ile Ile Thr Lys Trp Leu Lys Thr Asp Gln Trp  
500 505 510

Val Thr Asn Leu Glu Leu Leu Ala Asn Leu Arg Glu Phe Ala Asp Asn  
515 520 525

Ser Glu Leu His Ala Glu Trp Glu Ser Ala Lys Met Ala Asn Lys Gln  
530 535 540

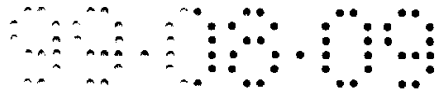
Arg Leu Ala Gln Tyr Ile Leu His Val Thr Gly Val Ser Ile Asp Pro  
545 550 555 560

Asn Ser Leu Phe Asp Ile Gln Val Lys Arg Ile His Glu Tyr Lys Arg  
565 570 575

Gln Leu Leu Asn Ile Leu Gly Val Ile Tyr Arg Tyr Lys Lys Leu Lys  
580 585 590

Gly Met Ser Pro Glu Glu Arg Lys Asn Thr Thr Pro Arg Thr Val Met  
595 600 605

Ile Gly Gly Lys Ala Phe Ala Thr Tyr Thr Asn Ala Lys Arg Ile Val  
610 615 620



Lys Leu Val Thr Asp Val Gly Asp Val Val Asn Ser Asp Pro Asp Val  
625 630 635 640

Asn Asp Tyr Leu Lys Val Val Phe Val Pro Asn Tyr Asn Val Ser Val  
645 650 655

5 Ala Glu Met Leu Ile Pro Gly Ser Glu Leu Ser Gln His Ile Ser Thr  
660 665 670

Ala Gly Met Glu Ala Ser Gly Thr Ser Asn Met Lys Phe Ala Leu Asn  
675 680 685

Gly Cys Leu Ile Ile Gly Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val Glu Ile Arg  
690 695 700

10 Glu Glu Ile Gly Glu Asp Asn Phe Phe Leu Phe Gly Ala Thr Ala Asp  
705 710 715 720

Glu Val Pro Gln Leu Arg Lys Asp Arg Glu Asn Gly Leu Phe Lys Pro  
725 730 735

Asp Pro Arg Phe Glu Glu Ala Lys Gln Phe Ile Arg Ser Gly Ala Phe  
740 745 750

15 Gly Thr Tyr Asp Tyr Asn Pro Leu Leu Glu Ser Leu Glu Gly Asn Ser  
755 760 765

Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Tyr Phe Leu Val Gly His Asp Phe Pro Ser  
770 775 780

Tyr Met Asp Ala Gln Ala Arg Val Asp Glu Ala Tyr Lys Asp Arg Lys  
785 790 795 800

20 Arg Trp Ile Lys Met Ser Ile Leu Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Phe  
805 810 815

Ser Ser Asp Arg Thr Ile Ser Gln Tyr Ala Lys Glu Ile Trp Asn Ile  
820 825 830

Ala Glu Cys Arg Val Pro \*

835

( 2 ) SEQ ID NO: 5 信息:

25 ( i ) 序列特征:

( A ) 长度: 3171 碱基对

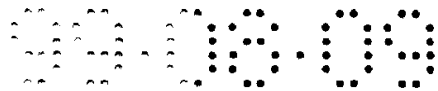
( B ) 类型: 核酸

( C ) 链型: 双链

( D ) 拓扑结构: 线性

30 ( ii ) 分子类型: DNA ( 基因组的 )

( iii ) 假设: 无



( iv ) 反义: 无

( vi ) 原始来源:

( A ) 生物体: Solanum tuberosum

( ix ) 特征:

5 ( A ) 名称/要点: CDS

( B ) 定位: 87..3011

( D ) 其它信息: /产物 = “马铃薯 α 葡聚糖 L - 型叶磷酸化酶”

( ix ) 特征:

10 ( A ) 名称/要点: 成熟\_肽

( B ) 定位: 330..3008

( ix ) 特征:

( A ) 名称/要点: 信号\_肽

( B ) 定位: 87..329

15 ( xi ) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

```

TTTTTTTTTT CAACATGCAC AACAATTATT TTGATTAAAT TTTGTATCTA AAAAATTTAGC      60
ATTTTGAAAT TCAGTTCAGA GACATC ATG GCA ACT TTT GCT GTC TCT GGA TTG      113
                Met Ala Thr Phe Ala Val Ser Gly Leu
                -81 -80                               -75

AAC TCA ATT TCA AGT ATT TCT AGT TTT AAT AAC AAT TTC AGA AGC AAA      161
Asn Ser Ile Ser Ser Ile Ser Ser Phe Asn Asn Asn Phe Arg Ser Lys
                -70                               -65                               -60

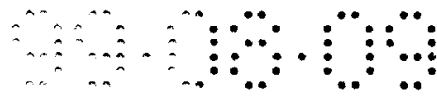
AAC TCA AAC ATT TTG TTG AGT AGA AGG AGG ATT TTA TTG TTC AGT TTT      209
Asn Ser Asn Ile Leu Leu Ser Arg Arg Arg Ile Leu Leu Phe Ser Phe
                -55                               -50                               -45

AGA AGA AGA AGA AGA AGT TTC TCT GTT AGC AGT GTT GCT AGT GAT CAA      257
Arg Arg Arg Arg Arg Ser Phe Ser Val Ser Ser Val Ala Ser Asp Gln
                -40                               -35                               -30                               -25

AAG CAG AAG ACA AAG GAT TCT TCC TCT GAT GAA GGA TTT ACA TTA GAT      305
Lys Gln Lys Thr Lys Asp Ser Ser Ser Asp Glu Gly Phe Thr Leu Asp
                -20                               -15                               -10

GTT TTT CAG CCG GAC TCC ACG TCT GTT TTA TCA AGT ATA AAG TAT CAC      353
Val Phe Gln Pro Asp Ser Thr Ser Val Leu Ser Ser Ile Lys Tyr His
                -5                               1                               5

```



GCT GAG TTC ACA CCA TCA TTT TCT CCT GAG AAG TTT GAA CTT CCC AAG 401  
Ala Glu Phe Thr Pro Ser Phe Ser Pro Glu Lys Phe Glu Leu Pro Lys  
10 15 20

GCA TAC TAT GCA ACT GCA GAG AGT GTT CGA GAT ACG CTC ATT ATA AAT 449  
Ala Tyr Tyr Ala Thr Ala Glu Ser Val Arg Asp Thr Leu Ile Ile Asn  
25 30 35 40

TGG AAT GCC ACA TAC GAA TTC TAT GAA AAG ATG AAT GTA AAG CAG GCA 497  
Trp Asn Ala Thr Tyr Glu Phe Tyr Glu Lys Met Asn Val Lys Gln Ala  
45 50 55

TAT TAC TTG TCT ATG GAA TTT CTT CAG GGA AGA GCT TTA CTC AAT GCT 545  
Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Phe Leu Gln Gly Arg Ala Leu Leu Asn Ala  
60 65 70

ATT GGT AAC TTG GGG CTA ACC GGA CCT TAT GCA GAT GCT TTA ACT AAG 593  
Ile Gly Asn Leu Gly Leu Thr Gly Pro Tyr Ala Asp Ala Leu Thr Lys  
75 80 85

CTC GGA TAC AGT TTA GAG GAT GTA GCC AGG CAG GAA CCG GAT GCA GCT 641  
Leu Gly Tyr Ser Leu Glu Asp Val Ala Arg Gln Glu Pro Asp Ala Ala  
90 95 100

TTA GGT AAT GGA GGT TTA GGA AGA CTT GCT TCT TGC TTT CTG GAC TCA 689  
Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg Leu Ala Ser Cys Phe Leu Asp Ser  
105 110 115 120

ATG GCG ACA CTA AAC TAC CCT GCA TGG GGC TAT GGA CTT AGA TAC CAA 737  
Met Ala Thr Leu Asn Tyr Pro Ala Trp Gly Tyr Gly Leu Arg Tyr Gln  
125 130 135

TAT GGC CTT TTC AAA CAG CTT ATT ACA AAA GAT GGA CAG GAG GAA GTT 785  
Tyr Gly Leu Phe Lys Gln Leu Ile Thr Lys Asp Gly Gln Glu Glu Val  
140 145 150

GCT GAA AAT TGG CTC GAG ATG GGA AAT CCA TGG GAA ATT GTG AGG AAT 833  
Ala Glu Asn Trp Leu Glu Met Gly Asn Pro Trp Glu Ile Val Arg Asn  
155 160 165

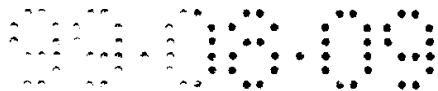
GAT ATT TCG TAT CCC GTA AAA TTC TAT GGG AAG GTC ATT GAA GGA GCT 881  
Asp Ile Ser Tyr Pro Val Lys Phe Tyr Gly Lys Val Ile Glu Gly Ala  
170 175 180

GAT GGG AGG AAG GAA TGG GCT GGC GGA GAA GAT ATA ACT GCT GTT GCC 929  
Asp Gly Arg Lys Glu Trp Ala Gly Gly Glu Asp Ile Thr Ala Val Ala  
185 190 195 200

TAT GAT GTC CCA ATA CCA GGA TAT AAA ACA AAA ACA ACG ATT AAC CTT 977  
Tyr Asp Val Pro Ile Pro Gly Tyr Lys Thr Lys Thr Thr Ile Asn Leu  
205 210 215

CGA TTG TGG ACA ACA AAG CTA GCT GCA GAA GCT TTT GAT TTA TAT GCT 1025  
Arg Leu Trp Thr Thr Lys Leu Ala Ala Glu Ala Phe Asp Leu Tyr Ala  
220 225 230





TTT AAC AAT GGA GAC CAT GCC AAA GCA TAT GAG GCC CAG AAA AAG GCT 1073  
Phe Asn Asn Gly Asp His Ala Lys Ala Tyr Glu Ala Gln Lys Lys Ala  
235 240 245

GAA AAG ATT TGC TAT GTC TTA TAT CCA GGT GAC GAA TCG CTT GAA GGA 1121  
Glu Lys Ile Cys Tyr Val Leu Tyr Pro Gly Asp Glu Ser Leu Glu Gly  
250 255 260

AAG ACG CTT AGG TTA AAG CAG CAA TAC ACA CTA TGT TCT GCT TCT CTT 1169  
Lys Thr Leu Arg Leu Lys Gln Gln Tyr Thr Leu Cys Ser Ala Ser Leu  
265 270 275 280

CAG GAC ATT ATT GCA CGG TTC GAG AAG AGA TCA GGG AAT GCA GTA AAC 1217  
Gln Asp Ile Ile Ala Arg Phe Glu Lys Arg Ser Gly Asn Ala Val Asn  
285 290 295

TGG GAT CAG TTC CCC GAA AAG GTT GCA GTA CAG ATG AAT GAC ACT CAT 1265  
Trp Asp Gln Phe Pro Glu Lys Val Ala Val Gln Met Asn Asp Thr His  
300 305 310

CCA ACA CTT TGT ATA CCA GAA CTT TTA AGG ATA TTG ATG GAT GTT AAA 1313  
Pro Thr Leu Cys Ile Pro Glu Leu Leu Arg Ile Leu Met Asp Val Lys  
315 320 325

GGT TTG AGC TGG AAG CAG GCA TGG GAA ATT ACT CAA AGA ACG GTC GCA 1361  
Gly Leu Ser Trp Lys Gln Ala Trp Glu Ile Thr Gln Arg Thr Val Ala  
330 335 340

TAC ACT AAC CAC ACT GTT CTA CCT GAG GCT CTT GAG AAA TGG AGC TTC 1409  
Tyr Thr Asn His Thr Val Leu Pro Glu Ala Leu Glu Lys Trp Ser Phe  
345 350 355 360

ACA CTT CTT GGT GAA CTG CTT CCT CGG CAC GTG GAG ATC ATA GCA ATG 1457  
Thr Leu Leu Gly Glu Leu Leu Pro Arg His Val Glu Ile Ile Ala Met  
365 370 375

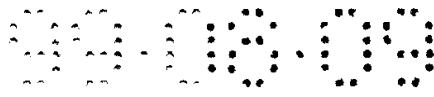
ATA GAT GAG GAG CTC TTG CAT ACT ATA CTT GCT GAA TAT GGT ACT GAA 1505  
Ile Asp Glu Glu Leu Leu His Thr Ile Leu Ala Glu Tyr Gly Thr Glu  
380 385 390

GAT CTT GAC TTG TTG CAA GAA AAG CTA AAC CAA ATG AGG ATT CTG GAT 1553  
Asp Leu Asp Leu Leu Gln Glu Lys Leu Asn Gln Met Arg Ile Leu Asp  
395 400 405

AAT GTT GAA ATA CCA AGT TCT GTT TTG GAG TTG CTT ATA AAA GCC GAA 1601  
Asn Val Glu Ile Pro Ser Ser Val Leu Glu Leu Leu Ile Lys Ala Glu  
410 415 420

GAA AGT GCT GCT GAT GTC GAA AAG GCA GCA GAT GAA GAA CAA GAA GAA 1649  
Glu Ser Ala Ala Asp Val Glu Lys Ala Ala Asp Glu Glu Gln Glu Glu  
425 430 435 440

GAA GGT AAG GAT GAC AGT AAA GAT GAG GAA ACT GAG GCT GTA AAG GCA 1697  
Glu Gly Lys Asp Asp Ser Lys Asp Glu Glu Thr Glu Ala Val Lys Ala  
445 450 455



GAA ACT ACG AAC GAA GAG GAG GAA ACT GAG GTT AAG AAG GTT GAG GTG 1745  
Glu Thr Thr Asn Glu Glu Glu Glu Thr Glu Val Lys Lys Val Glu Val  
460 465 470

GAG GAT AGT CAA GCA AAA ATA AAA CGT ATA TTC GGG CCA CAT CCA AAT 1793  
Glu Asp Ser Gln Ala Lys Ile Lys Arg Ile Phe Gly Pro His Pro Asn  
475 480 485

AAA CCA CAG GTG GTT CAC ATG GCA AAT CTA TGT GTA GTT AGC GGG CAT 1841  
Lys Pro Gln Val Val His Met Ala Asn Leu Cys Val Val Ser Gly His  
490 495 500

GCA GTT AAC GGT GTT GCT GAG ATT CAT AGT GAA ATA GTT AAG GAT GAA 1889  
Ala Val Asn Gly Val Ala Glu Ile His Ser Glu Ile Val Lys Asp Glu  
505 510 515 520

GTT TTC AAT GAA TTT TAC AAG TTA TGG CCA GAG AAA TTC CAA AAC AAG 1937  
Val Phe Asn Glu Phe Tyr Lys Leu Trp Pro Glu Lys Phe Gln Asn Lys  
525 530 535

ACA AAT GGT GTG ACA CCA AGA AGA TGG CTA AGT TTC TGT AAT CCA GAG 1985  
Thr Asn Gly Val Thr Pro Arg Arg Trp Leu Ser Phe Cys Asn Pro Glu  
540 545 550

TTG AGT GAA ATT ATA ACC AAG TGG ACA GGA TCT GAT GAT TGG TTA GTA 2033  
Leu Ser Glu Ile Ile Thr Lys Trp Thr Gly Ser Asp Asp Trp Leu Val  
555 560 565

AAC ACT GAA AAA TTG GCA GAG CTT CGA AAG TTT GCT GAT AAC GAA GAA 2081  
Asn Thr Glu Lys Leu Ala Glu Leu Arg Lys Phe Ala Asp Asn Glu Glu  
570 575 580

CTC CAG TCT GAG TGG AGG AAG GCA AAA GGA AAT AAC AAA ATG AAG ATT 2129  
Leu Gln Ser Glu Trp Arg Lys Ala Lys Gly Asn Asn Lys Met Lys Ile  
585 590 595 600

GTC TCT CTC ATT AAA GAA AAA ACA GGA TAC GTG GTC AGT CCC GAT GCA 2177  
Val Ser Leu Ile Lys Glu Lys Thr Gly Tyr Val Val Ser Pro Asp Ala  
605 610 615

ATG TTT GAT GTT CAG ATC AAG CGC ATC CAT GAG TAT AAA AGG CAG CTA 2225  
Met Phe Asp Val Gln Ile Lys Arg Ile His Glu Tyr Lys Arg Gln Leu  
620 625 630

TTA AAT ATA TTT GGA ATC GTT TAT CGC TAT AAG AAG ATG AAA GAA ATG 2273  
Leu Asn Ile Phe Gly Ile Val Tyr Arg Tyr Lys Lys Met Lys Glu Met  
635 640 645

AGC CCT GAA GAA CGA AAA GAA AAG TTT GTC CCT CGA GTT TGC ATA TTT 2321  
Ser Pro Glu Glu Arg Lys Glu Lys Phe Val Pro Arg Val Cys Ile Phe  
650 655 660

GGA GGA AAA GCA TTT GCT ACA TAT GTT CAG GCC AAG AGA ATT GTA AAA 2369  
Gly Gly Lys Ala Phe Ala Thr Tyr Val Gln Ala Lys Arg Ile Val Lys  
665 670 675 680



TTT ATC ACT GAT GTA GGG GAA ACA GTC AAC CAT GAT CCC GAG ATT GGT 2417  
Phe Ile Thr Asp Val Gly Glu Thr Val Asn His Asp Pro Glu Ile Gly  
685 690 695

GAT CTT TTG AAG GTT GTA TTT GTT CCT GAT TAC AAT GTC AGT GTA GCA 2465  
Asp Leu Leu Lys Val Val Phe Val Pro Asp Tyr Asn Val Ser Val Ala  
700 705 710

GAA GTG CTA ATT CCT GGT AGT GAG TTG TCC CAG CAT ATT AGT ACT GCT 2513  
Glu Val Leu Ile Pro Gly Ser Glu Leu Ser Gln His Ile Ser Thr Ala  
715 720 725

GGT ATG GAG GCT AGT GGA ACC AGC AAC ATG AAA TTT TCA ATG AAT GGC 2561  
Gly Met Glu Ala Ser Gly Thr Ser Asn Met Lys Phe Ser Met Asn Gly  
730 735 740

TGC CTC CTC ATC GGG ACA TTA GAT GGT GCC AAT GTT GAG ATA AGA GAG 2609  
Cys Leu Leu Ile Gly Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val Glu Ile Arg Glu  
745 750 755 760

GAA GTT GGA GAG GAC AAT TTC TTT CTT TTC GGA GCT CAG GCT CAT GAA 2657  
Glu Val Gly Glu Asp Asn Phe Phe Leu Phe Gly Ala Gln Ala His Glu  
765 770 775

ATT GCT GGC CTA CGA AAG GAA AGA GCC GAG GGA AAG TTT GTC CCG GAC 2705  
Ile Ala Gly Leu Arg Lys Glu Arg Ala Glu Gly Lys Phe Val Pro Asp  
780 785 790

CCA AGA TTT GAA GAA GTA AAG GCG TTC ATT AGG ACA GGC GTC TTT GGC 2753  
Pro Arg Phe Glu Glu Val Lys Ala Phe Ile Arg Thr Gly Val Phe Gly  
795 800 805

ACC TAC AAC TAT GAA GAA CTC ATG GGA TCC TTG GAA GGA AAC GAA GGC 2801  
Thr Tyr Asn Tyr Glu Glu Leu Met Gly Ser Leu Glu Gly Asn Glu Gly  
810 815 820

TAT GGT CGT GCT GAC TAT TTT CTT GTA GGA AAG GAT TTC CCC GAT TAT 2849  
Tyr Gly Arg Ala Asp Tyr Phe Leu Val Gly Lys Asp Phe Pro Asp Tyr  
825 830 835 840

ATA GAG TGC CAA GAT AAA GTT GAT GAA GCA TAT CGA GAC CAG AAG AAA 2897  
Ile Glu Cys Gln Asp Lys Val Asp Glu Ala Tyr Arg Asp Gln Lys Lys  
845 850 855

TGG ACC AAA ATG TCG ATC TTA AAC ACA GCT GGA TCG TTC AAA TTT AGC 2945  
Trp Thr Lys Met Ser Ile Leu Asn Thr Ala Gly Ser Phe Lys Phe Ser  
860 865 870

AGT GAT CGA ACA ATT CAT CAA TAT GCA AGA GAT ATA TGG AGA ATT GAA 2993  
Ser Asp Arg Thr Ile His Gln Tyr Ala Arg Asp Ile Trp Arg Ile Glu  
875 880 885

CCT GTT GAA TTA CCT TAA AAGTTAGCCA GTTAAAGGAT GAAAGCCAAT 3041  
Pro Val Glu Leu Pro \*  
890

TTTTTCCCCC TGAGGTTCTC CCATACTGTT TATTAGTACA TATATTGTCA ATTGTTGCTA 3101  
 CTGAAATGAT AGAAGTTTTG AATATTTACT GTCAATAAAA TACAGTTGAT TCCATTTGAA 3161  
 AAAAAAAAAA 3171

5 (2) SEQ ID NO: 6 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 975 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

10 (ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

Met Ala Thr Phe Ala Val Ser Gly Leu Asn Ser Ile Ser Ser Ile Ser  
 -81 -80 -75 -70  
 Ser Phe Asn Asn Asn Phe Arg Ser Lys Asn Ser Asn Ile Leu Leu Ser  
 -65 -60 -55 -50  
 Arg Arg Arg Ile Leu Leu Phe Ser Phe Arg Arg Arg Arg Arg Ser Phe  
 -45 -40 -35  
 Ser Val Ser Ser Val Ala Ser Asp Gln Lys Gln Lys Thr Lys Asp Ser  
 -30 -25 -20  
 Ser Ser Asp Glu Gly Phe Thr Leu Asp Val Phe Gln Pro Asp Ser Thr  
 -15 -10 -5  
 Ser Val Leu Ser Ser Ile Lys Tyr His Ala Glu Phe Thr Pro Ser Phe  
 1 5 10 15  
 Ser Pro Glu Lys Phe Glu Leu Pro Lys Ala Tyr Tyr Ala Thr Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Val Arg Asp Thr Leu Ile Ile Asn Trp Asn Ala Thr Tyr Glu Phe  
 35 40 45  
 Tyr Glu Lys Met Asn Val Lys Gln Ala Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Phe  
 50 55 60  
 Leu Gln Gly Arg Ala Leu Leu Asn Ala Ile Gly Asn Leu Gly Leu Thr  
 65 70 75  
 Gly Pro Tyr Ala Asp Ala Leu Thr Lys Leu Gly Tyr Ser Leu Glu Asp  
 80 85 90 95



Val Ala Arg Gln Glu Pro Asp Ala Ala Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly  
100 105 110

Arg Leu Ala Ser Cys Phe Leu Asp Ser Met Ala Thr Leu Asn Tyr Pro  
115 120 125

Ala Trp Gly Tyr Gly Leu Arg Tyr Gln Tyr Gly Leu Phe Lys Gln Leu  
130 135 140

Ile Thr Lys Asp Gly Gln Glu Glu Val Ala Glu Asn Trp Leu Glu Met  
145 150 155

Gly Asn Pro Trp Glu Ile Val Arg Asn Asp Ile Ser Tyr Pro Val Lys  
160 165 170 175

Phe Tyr Gly Lys Val Ile Glu Gly Ala Asp Gly Arg Lys Glu Trp Ala  
180 185 190

Gly Gly Glu Asp Ile Thr Ala Val Ala Tyr Asp Val Pro Ile Pro Gly  
195 200 205

Tyr Lys Thr Lys Thr Thr Ile Asn Leu Arg Leu Trp Thr Thr Lys Leu  
210 215 220

Ala Ala Glu Ala Phe Asp Leu Tyr Ala Phe Asn Asn Gly Asp His Ala  
225 230 235

Lys Ala Tyr Glu Ala Gln Lys Lys Ala Glu Lys Ile Cys Tyr Val Leu  
240 245 250 255

Tyr Pro Gly Asp Glu Ser Leu Glu Gly Lys Thr Leu Arg Leu Lys Gln  
260 265 270

Gln Tyr Thr Leu Cys Ser Ala Ser Leu Gln Asp Ile Ile Ala Arg Phe  
275 280 285

Glu Lys Arg Ser Gly Asn Ala Val Asn Trp Asp Gln Phe Pro Glu Lys  
290 295 300

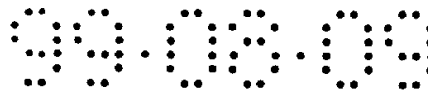
Val Ala Val Gln Met Asn Asp Thr His Pro Thr Leu Cys Ile Pro Glu  
305 310 315

Leu Leu Arg Ile Leu Met Asp Val Lys Gly Leu Ser Trp Lys Gln Ala  
320 325 330 335

Trp Glu Ile Thr Gln Arg Thr Val Ala Tyr Thr Asn His Thr Val Leu  
340 345 350

Pro Glu Ala Leu Glu Lys Trp Ser Phe Thr Leu Leu Gly Glu Leu Leu  
355 360 365

Pro Arg His Val Glu Ile Ile Ala Met Ile Asp Glu Glu Leu Leu His  
370 375 380



Thr Ile Leu Ala Glu Tyr Gly Thr Glu Asp Leu Asp Leu Leu Gln Glu  
385 390 395

Lys Leu Asn Gln Met Arg Ile Leu Asp Asn Val Glu Ile Pro Ser Ser  
400 405 410 415

Val Leu Glu Leu Leu Ile Lys Ala Glu Glu Ser Ala Ala Asp Val Glu  
420 425 430

Lys Ala Ala Asp Glu Glu Gln Glu Glu Glu Gly Lys Asp Asp Ser Lys  
435 440 445

Asp Glu Glu Thr Glu Ala Val Lys Ala Glu Thr Thr Asn Glu Glu Glu  
450 455 460

Glu Thr Glu Val Lys Lys Val Glu Val Glu Asp Ser Gln Ala Lys Ile  
465 470 475

Lys Arg Ile Phe Gly Pro His Pro Asn Lys Pro Gln Val Val His Met  
480 485 490 495

Ala Asn Leu Cys Val Val Ser Gly His Ala Val Asn Gly Val Ala Glu  
500 505 510

Ile His Ser Glu Ile Val Lys Asp Glu Val Phe Asn Glu Phe Tyr Lys  
515 520 525

Leu Trp Pro Glu Lys Phe Gln Asn Lys Thr Asn Gly Val Thr Pro Arg  
530 535 540

Arg Trp Leu Ser Phe Cys Asn Pro Glu Leu Ser Glu Ile Ile Thr Lys  
545 550 555

Trp Thr Gly Ser Asp Asp Trp Leu Val Asn Thr Glu Lys Leu Ala Glu  
560 565 570 575

Leu Arg Lys Phe Ala Asp Asn Glu Glu Leu Gln Ser Glu Trp Arg Lys  
580 585 590

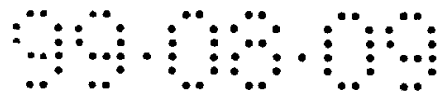
Ala Lys Gly Asn Asn Lys Met Lys Ile Val Ser Leu Ile Lys Glu Lys  
595 600 605

Thr Gly Tyr Val Val Ser Pro Asp Ala Met Phe Asp Val Gln Ile Lys  
610 615 620

Arg Ile His Glu Tyr Lys Arg Gln Leu Leu Asn Ile Phe Gly Ile Val  
625 630 635

Tyr Arg Tyr Lys Lys Met Lys Glu Met Ser Pro Glu Glu Arg Lys Glu  
640 645 650 655

Lys Phe Val Pro Arg Val Cys Ile Phe Gly Gly Lys Ala Phe Ala Thr  
660 665 670



Tyr Val Gln Ala Lys Arg Ile Val Lys Phe Ile Thr Asp Val Gly Glu  
                                 675                                680                                685  
 Thr Val Asn His Asp Pro Glu Ile Gly Asp Leu Leu Lys Val Val Phe  
                                 690                                695                                700  
 5 Val Pro Asp Tyr Asn Val Ser Val Ala Glu Val Leu Ile Pro Gly Ser  
                                 705                                710                                715  
 Glu Leu Ser Gln His Ile Ser Thr Ala Gly Met Glu Ala Ser Gly Thr  
   720                                725                                730                                735  
 Ser Asn Met Lys Phe Ser Met Asn Gly Cys Leu Leu Ile Gly Thr Leu  
                                 740                                745                                750  
 10 Asp Gly Ala Asn Val Glu Ile Arg Glu Glu Val Gly Glu Asp Asn Phe  
                                 755                                760                                765  
 Phe Leu Phe Gly Ala Gln Ala His Glu Ile Ala Gly Leu Arg Lys Glu  
                                 770                                775                                780  
 Arg Ala Glu Gly Lys Phe Val Pro Asp Pro Arg Phe Glu Glu Val Lys  
                                 785                                790                                795  
 15 Ala Phe Ile Arg Thr Gly Val Phe Gly Thr Tyr Asn Tyr Glu Glu Leu  
   800                                805                                810                                815  
 Met Gly Ser Leu Glu Gly Asn Glu Gly Tyr Gly Arg Ala Asp Tyr Phe  
                                 820                                825                                830  
 Leu Val Gly Lys Asp Phe Pro Asp Tyr Ile Glu Cys Gln Asp Lys Val  
                                 835                                840                                845  
 20 Asp Glu Ala Tyr Arg Asp Gln Lys Lys Trp Thr Lys Met Ser Ile Leu  
                                 850                                855                                860  
 Asn Thr Ala Gly Ser Phe Lys Phe Ser Ser Asp Arg Thr Ile His Gln  
                                 865                                870                                875  
 Tyr Ala Arg Asp Ile Trp Arg Ile Glu Pro Val Glu Leu Pro \*  
   880                                885                                890

( 2 ) SEQ ID NO : 7 信息:

25 ( i ) 序列特征:

( A ) 长度: 27 碱基对

( B ) 类型: 核酸

( C ) 链型: 单链

( D ) 拓扑结构: 线性

30 ( ii ) 分子类型: DNA ( 基因组的 )

( iii ) 假设: 无

( iv ) 反义: 无

( v ) 片段类型: 内部

( vi ) 原始来源:

( A ) 生物体: **Solanum tuberosum**

5

( ix ) 特征:

( A ) 名称/要点: **misc\_特征**

( B ) 定位: 1..27

( D ) 其它信息: /功能 = “引物” /标记 = **SPL 1**

( xi ) 序列描述: **SEQ ID NO: 7:**

10

ATTTCGAAAAG CTCGAGATT GCATAGA

27

( 2 ) **SEQ ID NO: 8** 信息:

( i ) 序列特征:

( A ) 长度: 27 碱基对

15

( B ) 类型: 核酸

( C ) 链型: 单链

( D ) 拓扑结构: 线性

( ii ) 分子类型: **DNA (基因组的)**

( iii ) 假设: 无

20

( iv ) 反义: 无

( v ) 片段类型: 内部

( vi ) 原始来源:

( A ) 生物体: **Solanum tuberosum**

( ix ) 特征:

25

( A ) 名称/要点: **misc\_特征**

( B ) 定位: 1..27

( D ) 其它信息: /功能 = “引物” /标记 = **SPL 2**

( xi ) 序列描述: **SEQ ID NO: 8:**

30

GTTTATTTTC CATCGATGGA AGGTGGT

27



## ( 2 ) SEQ ID NO: 9 信息:

## ( i ) 序列特征:

( A ) 长度: 23 碱基对

( B ) 类型: 核酸

5 ( C ) 链型: 单链

( D ) 拓扑结构: 线性

( ii ) 分子类型: DNA ( 基因组的 )

( iii ) 假设: 无

( iv ) 反义: 无

10 ( v ) 片段类型: 内部

( vi ) 原始来源:

( A ) 生物体: *Solanum tuberosum*

( ix ) 特征:

( A ) 名称/要点: misc\_特征

15 ( B ) 定位: 1..23

( D ) 其它信息: /功能 - “引物” /标记 - SPH 1

( xi ) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

GTGTGCTCTC GAGCATTGAA AGC

23

## 20 ( 2 ) SEQ ID NO: 10 信息:

## ( i ) 序列特征:

( A ) 长度: 25 碱基对

( B ) 类型: 核酸

( C ) 链型: 单链

25 ( D ) 拓扑结构: 线性

( ii ) 分子类型: DNA ( 基因组的 )

( iii ) 假设: 无

( iv ) 反义: 无

( v ) 片段类型: 内部

30 ( vi ) 原始来源:

( A ) 生物体: *Solanum tuberosum*

( ix ) 特征:

( A ) 名称/要点: misc\_特征

( B ) 定位: 1..25

( D ) 其它信息: /功能 = “引物” /标记 = SPH 2

5 ( xi ) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

ATAATATCCT GAATCGATGC ACTGC

25

说明书附图

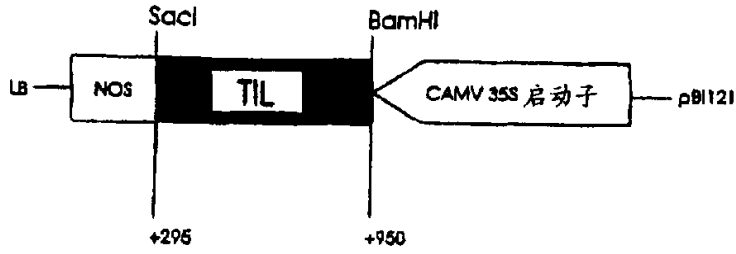


图 1

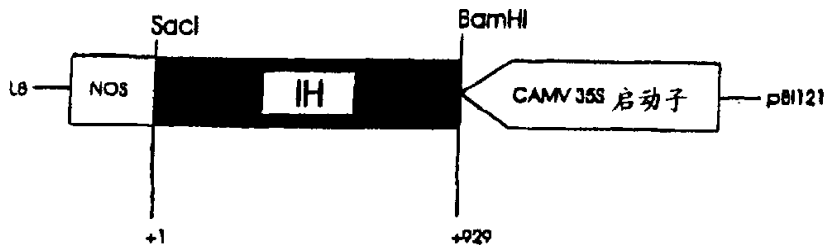


图 2

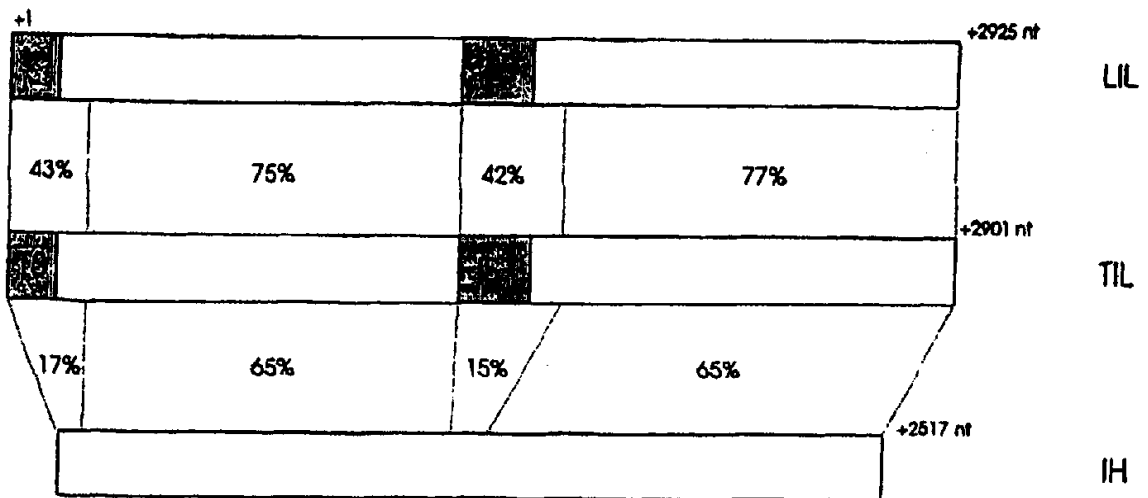


图 3

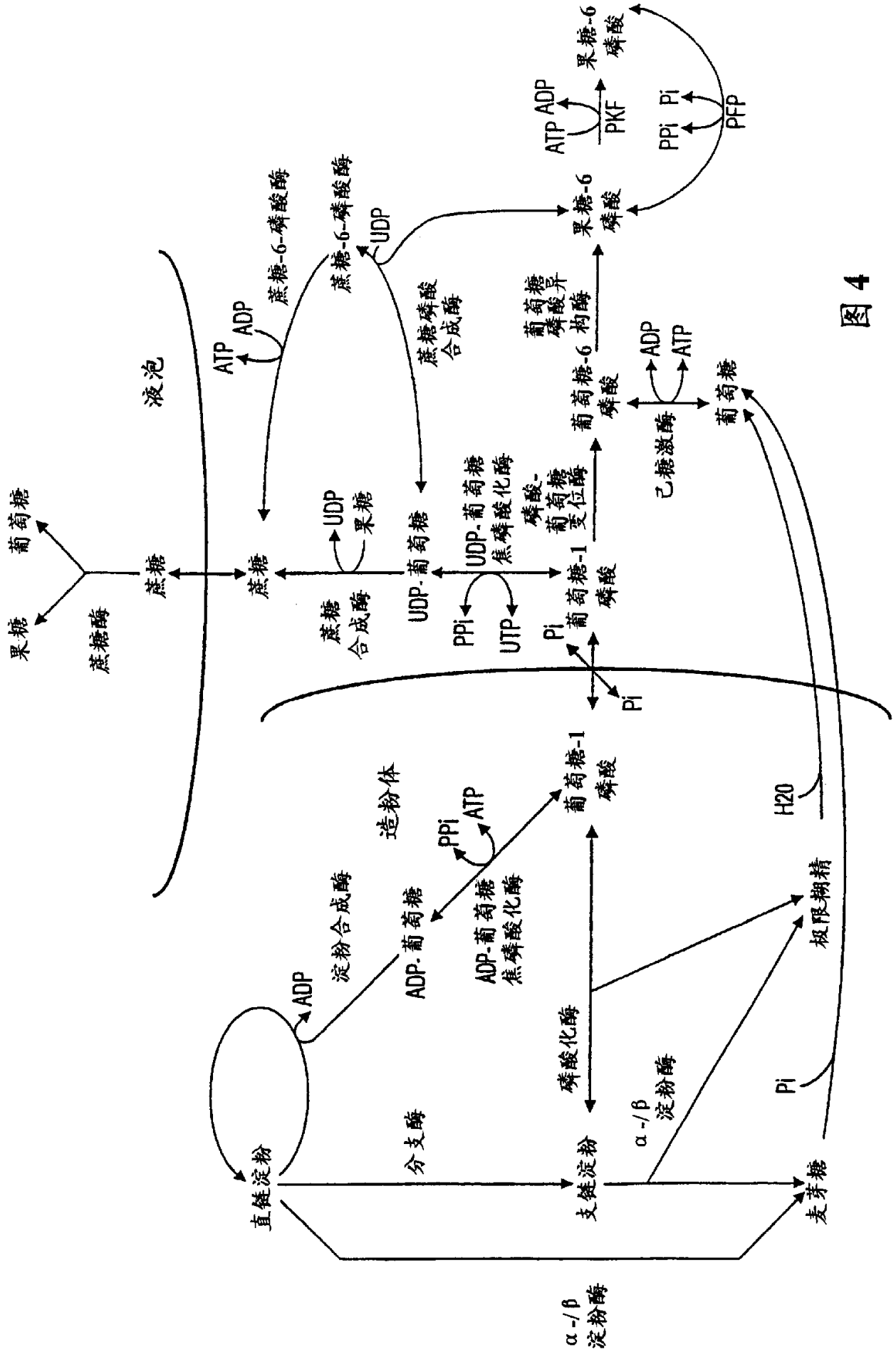


图 4

ELPKAYYA-TAESVRDTLIINWNATYEFYEKMNVKQAYYLSMEFLQGRAL	49
ELPKAFFA-TAQSVRDSLLINWNATYDIYEKLNMKQAYYLSMEFLQGRAL	49
EPLQAYYAATADSVRDRLIKQWNDTYLHYDKVNPQTYYLSMEYLQGRAL	50
* . . . * ** . ***** * . . ** . ** * . * . * ** . ***** . *****	
LNAIGNLGLTGPYADALTKLGYSLEDVARQEPDAALGNGGLGRLASCFLD	99
LNAIGNLELTGDFAEALKNLGHNLENVASQEPDAALGNGGLGRLASCFLD	99
TNAVGNLDIHNAYADALNKLGOQLEEVVEQEKDAALGNGGLGRLASCFLD	100
** . ***** . . . * . ** . ** * . * . * ** . ***** . *****	
SMATLNYPAWGYGLRYQYGLFKQLITKDGQEEVAENWLEMGNPWEIVRND	149
SLATLNYPAWGYGLRYKYGLFKQRITKDGQEEVAEDWLEIGSPWEVVRND	149
SMATLNLPAWGYGLRYRYGLFKQLITKAGQEEVPEDWLEKFSPEIVRHD	150
* . ***** . ***** . ***** * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
ISYPVKFYGKVIEGADGRKEWAGGEDITAVAYDVPIPGYKTKTTINLRLW	199
VSYPVKFYGKVSTGSDGKRYWIGGEDIKAVAYDVPIPGYKTRTTISLRLW	199
VVFPPIRFFGHVEVLPSGSRKWVGGEVLQALAYDVPIPGYRTKNTNSLRLW	200
. . * . * . * . * . . * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
TTKLAAEAFDLYAFNNGDH	218
STQVPSADFDLSAFNAGEH	218
EAKASSEDFNLFLFNDGQY	219
... . . . * . * . * . * . *	

图 5

GAACTTCCCAAGGCATACTATGCA---ACTGCAGAGAGTGTTTCGAGATAC 47  
 GAGCTCCCTAAGGCATTCTTTGCA---ACAGCTCAAAGTGTTTCGTGATTC 47  
 GAGCCACTACAAGCATACTATGCTGCTACTGCTGACAGTGTTTCGTGAT-C 49  
 \*\*.\* \* \* .\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*. \*\*.\*. \* \*\*\*\*\*.\*\*\* \*

GCTCATTATAA-ATTGGAATGCCACATACGAATTCTATGAAAAGATGAAT 96  
 GCTCCTTATTA-ATTGGAATGCTACGTATGATATTTATGAAAAGCTGAAC 96  
 GCTTGATCAAACAATGGAATGACACCTATCTTCATTATGACAAAAGTTAAT 99  
 \*\*\* . \* ..\* \* .\*\*\*\*\* \*\* \*\* . . . \*\*\*\*\* \*\* , \* .\*\*

GTAAAGCAGGCATATTACTTGTCTATGGAATTTCTTCAGGGAAGAGCTTT 146  
 ATGAAGCAAGCGTACTATCTATCCATGGAATTTCTGCAGGGTAGAGCATT 146  
 CCAAAGCAAACATACTACTTATCAATGGAGTATCTCCAGGGGCGAGCTTT 149  
 .\*\*\*\*\*. \* .\*\* \*\* \* .\*\* \*\*\*\*\* . \* .\*\* \*\*\*\*\* . \*\*\*\*\* .\*\*

ACTCAATGCTATTGGTAACTTGGGGCTAAC-CGGACCTTATGCAGATGCT 195  
 GTTAAATGCAATTGGTAACTCTGGAGCTTAC-TGGTGACTTTCGCGAAGCT 195  
 GACAAATGCAGTTGGAACTTAGA-CATCCACAATGCATATGCTGATGCT 198  
 . \*\*\*\*\* .\*\*\*\*\*. \*\* \* . \* . \* . . . \* .\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*

TTAAC TAAGCTCGGATACAGTTTAGAGGATGTAGCCAGGCAGGAACCGGA 245  
 TTGAAAACCTTGGCCACAATCTAGAAAATGTGGCTTCTCAGGAACCAGA 245  
 TTAACAAACTGGGTGAGCAGCTTGGAGGTCGTTGAGCAGGAAAAAGA 248  
 \*\*.\* \*\*.\* \*\* \*\* \* .. \* .\*\*\*.\*\*\* \*\* \* . .\*\*\*\*\* \*\*

TGCAGCTT TAGGTAATGGAGGTTTAGGAAGACTTGCTTCTTGCTTCTGG 295  
 TGCTGCTCTTGGAAATGGGGGTTTGGGACGGCTTGCTTCTGTTTCTGG 295  
 TGCAGCATTAGGAAATGGTGGTTTAGGAAGGCTCGCTTCATGCTTCTTG 298  
 \*\*\*.\*\*\*. \* .\*\* .\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* .\*\*\* \* .\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \* .\*

ACTCAATGGCGACACTAAACTACCCTGCATGGGGCTATGGACTTAGATAC 345  
 ACTCTTTGGCAACACTAAACTACCCAGCATGGGGCTATGGACTTAGGTAC 345  
 ATCCATGGCCACATTGAACCTTCCAGCATGGGGTTATGGCTTGAGGTAC 348  
 \* \*\* .\*\*\*\*\* \*\*\* \* .\*\*\* . \*\* .\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* .\*\*\*.\*\*\*

CAATATGGCCTTTTCAAACAGCTTATTACAAAAGATGGACAGGAGGAAGT 395  
 AAGTATGGTTTATTTAAGCAACGGATTACAAAAGATGGTCAGGAGGAGGT 395  
 AGATATGGACTTTTAAAGCAGCTTATCACAAGGCTGGGCAAGAAGAAGT 398  
 ..\*\*\*\*\* \* .\*\* \*\* .\*\* .\*\* .\*\* \*\*\*\*\* . \* \*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*

TGCTGAAAATTGGCTCGAGATGGGAAATCCATGGGAAATTGTGAGGAATG 445  
 GGCTGAAGATTGGCTTGAATTTGGCAGTCCATGGGAAGTTGTGAGGAATG 445  
 TCCTGAAGATTGGTTGGAGAAATTTAGTCCCTGGGAAATTGTAAGGCATG 448  
 . \*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* \* \*\* \* . . . . \* .\*\*\* \*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* .\*\*\* \*\*

ATATTTTCGTATCCCGTAAAATTCTATGGGAAGGTCATTGAAGGAGCTGAT 495  
 ATGTTTCATATCCTATCAAATTCTATGGAAAAGTCTCTACAGGATCAGAT 495  
 ATGTTGCTTTCCTATCAGGTTTTTTGGTTCATGTTGAAGTCCCTCCCTTCT 498  
 \*\*.\*. \* .\*\*\* \* \* .\*\* \* .\*\*\* .\*\*\* . . . \* .\*\* \*

图 6A

GGGAGGAAGGAATGGGCTGGCGGAGAAGATATAACTGCTGTTGCCTATGA 545  
GGAAAGAGGTATTGGATTGGTGGAGAGGATATAAAGGCAGTTGCGTATGA 545  
GGCTCGCGAAAATGGGTTGGTGGAGAGGTCCTACAGGCTCTTGCATATGA 548  
\*\* . \* ...\*.\*\*\*. \*\*\* \*\*\*\*\*.\*. \*\* .\*\* . \*\*\*\* \*\*\*\*\*

TGTCCCAATACCAGGATATAAAACAAAACAACGATTAACCTTCGATTGT 595  
TGTCCCATAACCAGGGTATAAGACCAGAACCACAATCAGCCTTCGACTGT 595  
TGTGCCAATTCCAGGATACAGAACTAAAACACTAATAGTCTTCGTCTCT 598  
\*\*\* \*\* \*.\*\*\*\*\*.\* \* .\*\* \* .\*\* \*\*.\*. \*. \*\*\*\*\*. \* \*

GGACAAC-AAAGCTAGCTGCAGAAGCTTTTGATTTATATGCTTTTAACAA 644  
GGTCTAC-ACAGGTTCCATCAGCGGATTTTGATTTATCTGCTTTCAATGC 644  
GGGAAGCCAAAGCAAGCT-CTGAGGATTTCAACTTGTTTCTGTTTAATGA 647  
\*\* . . \* \* \*\* .. \*. \* . \* . \* \*\*\* . \* \*\* . \* \* . \*\* \*\* .

TGGAGACCATGC 656  
TGGAGAGCACAC 656  
TGGACAGTATGA 659  
\*\*\*\* \* \* .

图 6B

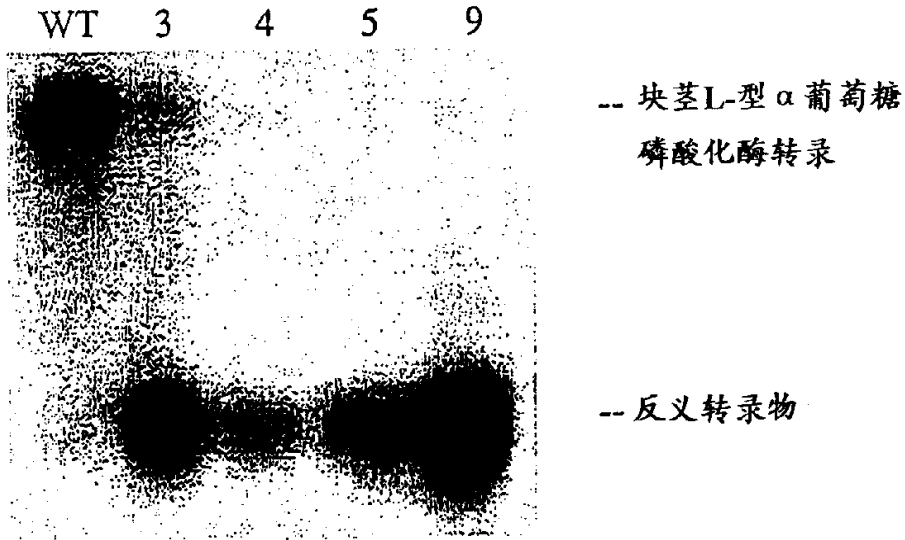


图 7



图 8

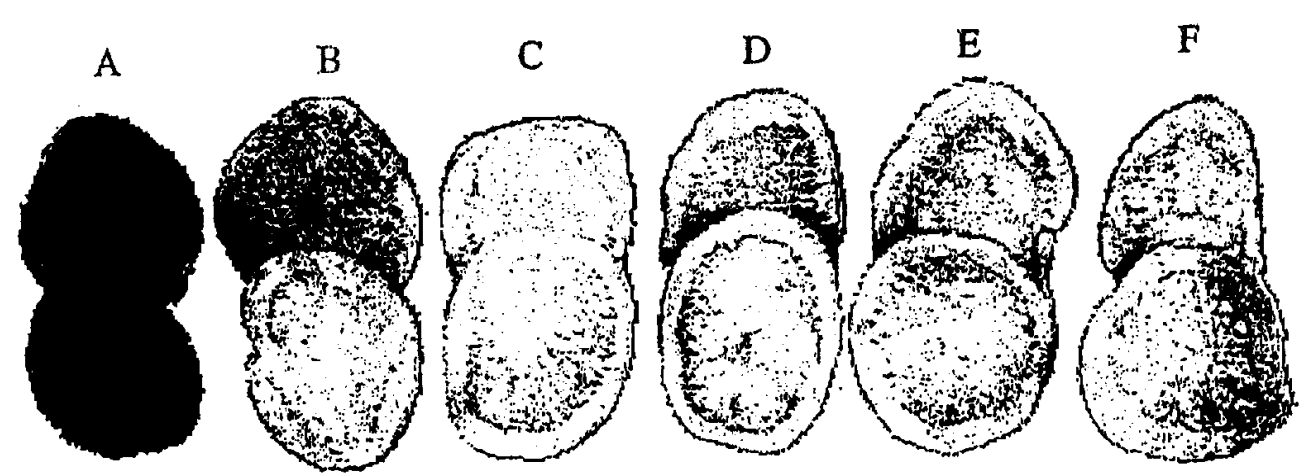


图 9



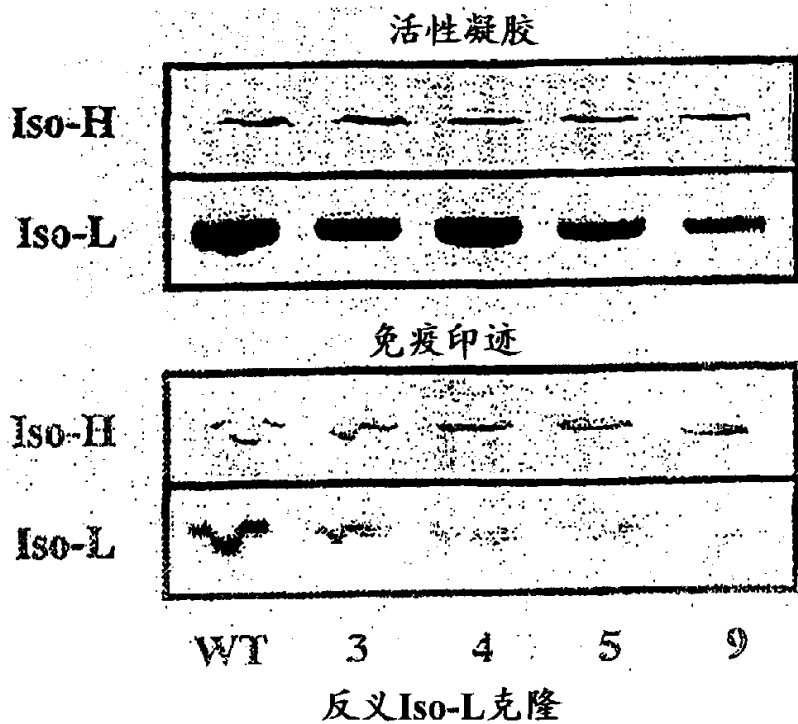


图 10

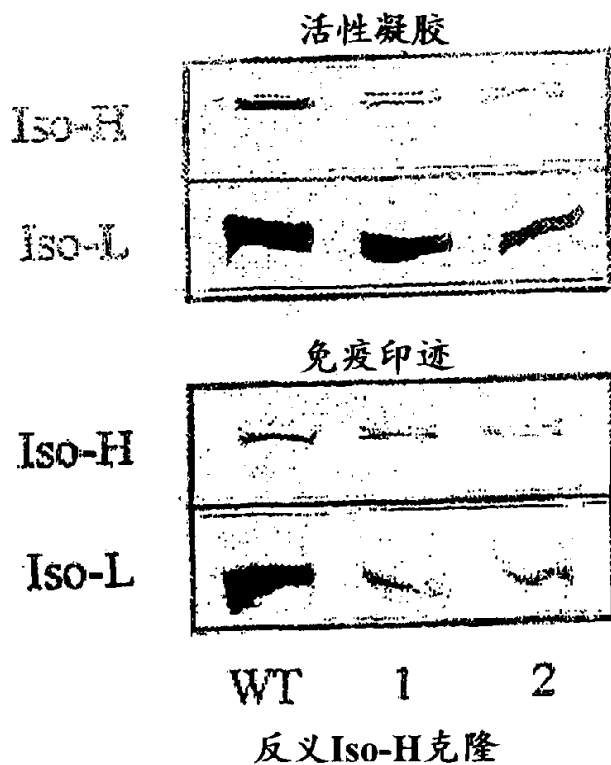


图 11